

SÉRIE A, N° 2804

N° D'ORDRE :
3.676

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences
de l'Université de Paris

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

MONIQUE DIGEON

ATTACHÉE DE RECHERCHES
A L'INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

-
- 1^{re} THÈSE.** Contribution à l'étude de la toxine typhoïdique. La toxine extraite des formes rough du bacille typhique.
- 2^{me} THÈSE.** Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 10 Juin 1955 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER, Président.

FROMAGEOT }
LEDERER } Examinateurs.

[1955]

Série A, N° 2804
N° D'Ordre :
3.676

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Monique D I G E O N

ATTACHEE DE RECHERCHES

A L'INSTITUT NATIONAL D'HYGIENE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA
PREMIERE THESE : TOXINE TYPHOIDIQUE - LA TOXINE EXTRAITE
DES FORMES ROUGH DU BACILLE TYPHIQUE
DEUXIEME THESE : PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 10 Juin 1955 devant la Commission d'examen.

MM. WURMSER *Président*

FROMAGEOT }
LEDERER } *Examineurs*

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Doyen J. PERES

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	DAMJON	T Astronomie.
E. DARMOIS	T Enseignement de Physique.	FROMAGEOT	T Chimie biologique.
R. LEVY	T Physiologie comparée.	LAPORTE	T Physique Générale et Radioact.
FOCH	T Mécanique Physique et Exper.	JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale.	PETIT	T Biologie maritime.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	QUENEY	T Météorologie et dynam. atmos.
JOB	T Chimie générale.	GALLIEN	T Embryologie.
PRENANT	T Anatomie et Histol. comparées.	EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).
GARNIER	T Géométrie supérieure.	DE CUGHAC	T Biologie végétale (P.C.B.).
PERES	T Mécanique des fluides et applications.	Melle CAUCHOIS	T Chimie physique.
LAUGIER	T Physiologie générale.	THELLIER	T Physique du Globe.
M. CURIE	T Physique (P.C.B.).	AUDUBERT	T Electrochimie.
BARRABE	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	L'HERITIER	T Génétique.
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique Mathématiques.	GRIVET	T Radioélectricité.
J. BOURCART ...	T Géographie physique et Géologie dynamique.	PONCIN	T Mécanique des fluides.
Mme JOLIOT-CURIE	T Physique nucléaire et Radioactivité	THIRY	T Mécanique appliquée.
PLANTEFOL	T Botanique.	DUBREIL	T Arithm. et théor. des nombres.
CABANNES	T Recherches physiques.	QUELET	T Chimie organique.
GRASSE	T Evolution des être organisés.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
PREVOST	T Chimie organique.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CUVILLIER	T Géol. struct. et Géol. appl.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	JUNG	T Pétrographie.
WYART	T Minéralogie.	TRILLAT	T Chimie physique.
TEISSIER	T Zoologie.	WIEMANN	T Chimie (M.P.C.).
MANGENOT	T Biologie végétale.	JACQUINOT	T Spectroscopie et Phys. céleste.
P. AUGER	T Physique quantique et relativ.	VASSY	T Physique de l'atmosphère.
MONNIER	T Physiologie des fonctions.	DESTOUCHES	T Théories Physiques.
PIVETEAU	T Géologie.	M. PRUVOST	T Géologie.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	AMIEL	T Chimie (P.C.B.).
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	HOCART	T Minéralogie.
LAFFITTE	T Chimie générale.	J.P. MATHIEU ..	T Physique (P.C.B.).
FAVARD	T Mécanique générale.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
COULOMB	T Physique du globe.	MAY	T Biologie animale (P.C.B.).
Melle COUSIN ..	T Biologie animale (P.C.B.).	CHOQUET	T Calcul diff. et intégral.
CHRETIEN	T Chimie minérale.	FELDMANN	T Biologie (P.C.B.).
P. DRACH	T Zoologie.	GUINIER	T Physique (P.C.B.).
KASTLER	T Physique.	JOST	T Biologie (P.C.B.).
EPHROSSI	T Génétique.	FORTET	T Calcul des probabilités.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	SCHWARTZ	T Méth. Mathém. de la physique.
RIVIERE	T Géologie (S.P.C.N.).	CHOUARD	T Physiologie végétale.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	MALAVARD	T Aviation.
LUCAS	T Physique.	BRELOT	T Calcul différentiel.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	NORMANT	T Chimie (P.C.B.).
ARNULF	T Optique appliquée.	BENARD	T Chimie (P.C.B.).
Max MORAND	T Physique.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
SOLEILLET	T Physique.	GELOSO	T Chimie (P.C.B.).
FORTIER	T Mécanique exper. des fluides.	SOULAIRAC	T Psychophysologie.
		ULRICH	T Physiologie végétale.
		MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
		KIRRMANN	T Théories chimiques.
		CHADEFAUD	T Botanique.
		DESTRIAU	T Physique (M.P.C.).
		Melle LE BRETON	T Physiologie générale.
		SALEM	T Mathématiques générales.

Secrétaire Général Ch. MONIER



Ce travail a été effectué au service des Anaérobies et de Chimie microbienne de l'Institut Pasteur, annexe de Garches, sous la direction de M. le Professeur M. RAYNAUD, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui a inspiré et constamment orienté ces recherches. Je tiens à lui témoigner ma profonde gratitude pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et pour les directives et les précieux conseils dont il m'a fait bénéficier.

Je suis heureuse d'exprimer mes remerciements à M. le Professeur WURMSER, dont j'ai été autrefois l'élève, pour avoir bien voulu s'intéresser à cette étude et présider cette thèse.

Je remercie M. le Professeur FROMAGEOT, qui a bien voulu accepter de faire partie de mon jury, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour les judicieux conseils qu'il m'a donnés.

Je tiens aussi à remercier M. le Professeur LEDERER d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

C'est pour moi un agréable devoir d'exprimer ma gratitude à M. le Professeur BUGNARD, professeur de Physique biologique à la faculté de Médecine de Toulouse, Directeur de l'Institut National d'Hygiène, dont j'ai été l'élève, pour m'avoir intégrée dans les cadres de recherches de l'Institut National d'Hygiène.

Je tiens à assurer de ma respectueuse reconnaissance M. le Professeur TREFOUEL, Directeur de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu m'accepter à l'Institut Pasteur à titre d'attachée de recherches de l'Institut National d'Hygiène.

Il m'est agréable de remercier M. le Docteur PREVOT, chef de service à l'Institut Pasteur, qui m'a reçue dans son service et m'a appris à joindre les techniques de chimie biologique à celles de bactériologie.

J'ai pu accomplir cette étude grâce à M. le Docteur BONNEFOI, chef de service à l'Institut Pasteur, qui a mis à ma disposition les souches de Salmonelles et les cultures qui m'étaient nécessaires. Qu'il veuille bien trouver ici mes sincères remerciements. Je suis particulièrement heureuse de remercier très vivement M. le Docteur Le MINOR, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, de l'inépuisable complaisance avec laquelle il m'a procuré de nombreuses souches et fourni de grandes quantités de bactéries.

C'est un plaisir pour moi de témoigner ma vive gratitude à Mademoiselle A.M. STAUB, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, pour l'aide amicale et dévouée qu'elle m'a apportée et pour les utiles suggestions qu'elle m'a faites.

Les analyses chimiques élémentaires de mes préparations ont été effectuées par Mademoiselle HAMON, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, Messieurs BAGILET et MARTIN, les électrophorèses par Monsieur DE MENDE, du centre d'électrophorèse du C.N.R.S. Je les remercie vivement.

Que tous mes collègues du laboratoire soient assurés de ma sincère gratitude pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans ce travail, particulièrement Madame BLASS qui a bien voulu se charger des études par chromatographie et électrophorèse sur papier, Monsieur RELYVELD qui m'a initiée aux techniques de précipitation spécifique en gel et m'a fait les photographies, Messieurs TURPIN, BIZZINI et MANGALO qui m'ont aimablement aidée.

Je n'oublie pas la collaboration efficace et dévouée de Madame RIZA et de Monsieur PERY.

C'est pour moi un agréable devoir d'exprimer ici ma fidèle gratitude à M. le Professeur ANDRIEU, professeur de Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale à la Faculté de Médecine de Toulouse, dont j'ai été l'élève et l'assistante, et auquel je dois mon orientation vers la recherche scientifique. Je n'oublie pas avec quelle bienveillance il m'a accueillie dans son laboratoire, avec quelle sollicitude, il m'a formée à la bactériologie. Qu'il veuille bien me permettre, en témoignage de mon respectueux attachement et de ma profonde reconnaissance, de lui dédier ce modeste travail.

Je tiens aussi à exprimer mes vifs remerciements à Madame ENJALBERT, agrégée de Bactériologie, Maître de conférences à la Faculté de Médecine de Toulouse, dont l'enseignement quotidien de la microbiologie m'a été si précieux et qui m'a toujours témoigné beaucoup d'amitié, et à Monsieur le Docteur AVERSENQ, chef de Travaux de Bactériologie à la Faculté de Médecine de Toulouse, qui m'a initiée avec beaucoup de complaisance et de dévouement aux techniques de bactériologie.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553821_0025

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA TOXINE TYPHOÏDIQUE

LA TOXINE

EXTRAITE DES

F O R M E S R O U G H

D U B A C I L L E T Y P H I Q U E

$\frac{1}{2} - \frac{1}{3} = \frac{3}{6} - \frac{2}{6} = \frac{1}{6}$

INTRODUCTION

Dans la plupart des maladies infectieuses, s'est posé très vite après le début de l'ère pasteurienne le problème de la virulence et du pouvoir toxinogène des microbes pathogènes.

Dans quelques maladies particulières, on a pu montrer que toute l'action nocive est due au fait que le germe considéré élabore une substance particulière, qui passe facilement dans le milieu de culture et à laquelle on a donné le nom d'exotoxine. Ces maladies sont relativement peu nombreuses : tétanos, diphtérie, botulisme et gangrènes anaérobies.

Pour les deux premières, il n'existe qu'une seule substance toxique qui est capable de reproduire tout le tableau de la maladie humaine ou animale : les toxines tétanique et diphtérique sont des protéines, obtenues à l'état de grande pureté. Il n'existe au point de vue immunologique qu'un seul type de toxine tétanique et un seul type de toxine diphtérique.

Pour le botulisme, le problème est déjà plus complexe : il existe une série de germes *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E et F qui élaborent chacun une toxine distincte des autres au point de vue immunologique. Mais toutes donnent chez l'animal les mêmes symptômes. Trois d'entre elles ont été obtenues sous forme purifiée, les toxines A, B, et C ; ce sont des protéines.

Pour les clostridies de la gangrène gazeuse, on sait qu'elles élaborent chacune plusieurs toxines, vraisemblablement toutes de nature protéique et dont certaines seulement ont été purifiées. Appartiennent à ce groupe les toxines α , η et θ de *Welchia Perfringens* A, la toxine ξ de *Welchia Perfringens* D, les toxines de *Clostridium Oedematiens*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium hemolyticum*, *Clostridium Sordelli*, *Clostridium septicum*.

Dans quelques autres cas, on a pu mettre aussi en évidence l'existence d'un principe toxique soluble de nature protéique qui est sécrété par les germes ; citons les toxines α , β et γ de *Staphylococcus pyogenes*, les hémolysines de *Streptococcus pyogenes*.

En dehors de ces cas, qui ne représentent qu'un nombre limité de germes pathogènes, on ne trouve pas dans les milieux de culture de poisons solubles qui puissent rendre compte des altérations pathologiques provoquées par le germe pathogène considéré. Ces germes ne sécrétant pas de toxine soluble dans le milieu de culture peuvent être séparés en deux groupes :

1) - Dans le premier groupe, on peut ranger les germes dont les corps microbiens tués sont toxiques et dont on peut extraire des poisons solubles par diverses techniques.

On dit que ces germes contiennent une endotoxine et l'on admet que les manifestations pathologiques sont dues à la libération, dans l'organisme infecté, de ces poisons endobactériens.

Notons que la lyse de ces bactéries après leur mort libère de la toxine dans les milieux des cultures âgées.

Les bactéries qui ont été le mieux étudiées à ce point de vue sont les bactéries gram négatives intestinales, les entérobactéries.

2) - Dans un deuxième groupe, on place les bactéries dont les corps microbiens tués sont peu ou pas toxiques et dont on n'a pu extraire de poison soluble par aucune des techniques employées.

Le représentant type de ce groupe est *Diplococcus pneumoniae*. On ne sait pas exactement quelle est l'origine des troubles et de la mort éventuelle chez les animaux infectés par ces germes.

Pour ces deux groupes de bactéries, qui sont toutes des parasites obligatoires ou facultatifs de l'homme, des animaux ou des plantes, un deuxième problème se pose, en dehors de leur pouvoir toxique éventuel, c'est leur virulence.

La virulence est la propriété que possèdent certaines souches et non d'autres de ces types de germes de se développer dans l'organisme des animaux.

Dans le cas du pneumocoque, cette propriété est la seule qui puisse être étudiée expérimentalement, puisqu'on ne peut extraire de substance toxique de ces germes.

Pour les organismes du type des entérobactéries, les deux propriétés, virulence et pouvoir endotoxique, ne sont pas toujours associées.

Dans un grand nombre de cas, on ne connaît pas encore vraiment le déterminisme de la virulence.

Dans le cas du pneumocoque, on a pu établir que seules les souches Smooth sont virulentes pour l'animal. On sait que la transformation Smooth → Rough dans cette espèce est une mutation irréversible, de faible fréquence. Elle survient sans raison apparente au cours des repiquages successifs. Elle se traduit par une modification de l'aspect macroscopique des colonies. Les colonies Smooth sont arrondies, régulières, luisantes. Les colonies Rough sont irrégulières, sèches.

Mais, fait capital, cette transformation dans l'aspect des colonies s'accompagne d'un changement de structure de la bactérie elle-même. Les souches Smooth possèdent une capsule de nature polysidique. Les polysides Smooth sont variables dans leur composition chimique et dans leur comportement immunologique, suivant le type sérologique considéré de pneumocoque : on connaît au moins trente-deux types distincts. On a élucidé la structure de plusieurs d'entre eux. Le mieux connu est le polyside S III. Lors de la transformation Smooth → Rough, la perte de l'antigène capsulaire polysidique entraîne la perte des propriétés sérologiques caractéristiques du type, si bien que les divers types Smooth donnent tous naissance à la même catégorie sérologique de type Rough.

Les bactéries Smooth, pourvues de polyside spécifique, sont pathogènes pour la souris, c'est-à-dire qu'injectées en nombre réduit (1 à 10 ou 100 bactéries) par voie intraveineuse à cet animal, elles provoquent la mort. Les bactéries Rough ne sont pas pathogènes : même injectées en très grand nombre à la souris, elles sont éliminées sans que l'animal soit malade.

D'autre part, les sérums obtenus chez le lapin par injection de bactéries smooth tuées et qui possèdent une activité agglutinante vis-à-vis des bactéries smooth et précipitante vis-à-vis du polyside spécifique correspondant, possèdent un pouvoir protecteur anti-infectieux : ces sérums, à dose convenable, empêchent le développement des souches virulentes smooth correspondantes chez l'animal.

On voit donc que dans le cas du Pneumocoque, on est arrivé à une élucidation partielle du problème de la virulence.

La virulence d'une souche est liée à la présence, à la surface de la bactérie, d'un antigène capsulaire, de nature polysidique, de structure déterminée, variable selon les types sérologiques. Et, par voie de conséquence, les vaccins anti-pneumococciques pour être efficaces doivent être préparés avec des suspensions smooth de tous les types sérologiques connus.

Les formes Rough ne sont pas virulentes. Elles se comportent comme des bactéries non pathogènes.

Ni les formes Smooth, ni les formes Rough du Pneumocoque ne contiennent d'endotoxine.

En ce qui concerne les Entérobactéries, on a cherché à retrouver des propriétés parallèles à celles du Pneumocoque dans les formes Smooth et Rough.

La variation Smooth → Rough y est connue depuis fort longtemps. La modification antigénique qui accompagne cette transformation est analogue à celle que l'on observe chez les pneumocoques. Mais l'antigène qui est présent dans les formes Smooth et absent dans les formes Rough n'est pas de structure chimique aussi simple que dans le cas des pneumocoques. Au lieu d'être un simple polyside, c'est un complexe polyside-protéine-lipide. D'autre part, et c'est là la deuxième différence, cet antigène complexe est toxique. Comme lorsqu'on extrait cet antigène, appelé antigène somatique O ou antigène O, la toxicité est aussi éliminée, on a été amené à considérer que les formes Rough, ne possédant pas cet antigène O, étaient dépourvues d'endotoxine. On arrivait ainsi à une représentation simplifiée inspirée des résultats obtenus dans le cas du pneumocoque :

Forme Smooth	→	Forme Rough
Antigène O		sans antigène O
Toxique		non toxique
Virulente		avirulente

Effectivement, les formes Rough sont avirulentes. Les sérums anti-Rough sont dépourvus de pouvoir protecteur anti-microbien contre les formes virulentes, alors que les sérums anti-antigène somatique sont doués de pouvoir protecteur.

Ce schéma a été admis pendant longtemps, malgré le fait expérimental suivant, signalé incidemment par divers auteurs : Si les bactéries Rough tuées sont peu toxiques quand on les compare aux formes Smooth correspondantes, elles possèdent cependant une certaine toxicité. Mais aucune des techniques qui avaient permis d'extraire des formes Smooth des antigènes solubles, des endotoxines, n'avait permis d'obtenir des substances toxiques solubles à partir des formes Rough.

D'autre part, les antigènes non toxiques qui en avaient été extraits présentaient les réactions colorées et les réactions de précipitation des protéines. On avait admis plus ou moins

implicitement que ces antigènes étaient des protéines, ce qui les opposait encore davantage aux antigènes somatiques des formes Smooth, considérés pendant longtemps comme purement glucido-lipidiques. (On sait aujourd'hui qu'ils peuvent contenir une protéine dont les réactions sont plus ou moins masquées dans le complexe.)

Nous montrerons, au cours de ce travail, que l'on peut extraire des formes Rough un antigène qui est poids pour poids aussi toxique que l'antigène somatique O des formes Smooth, correspondant. (La toxicité plus faible des bactéries en forme Rough est due au fait que la proportion de cet antigène toxique est plus faible que celle du complexe correspondant O dans les formes Smooth).

Contrairement aux données classiques, cet antigène Rough n'est pas une protéine simple. C'est un complexe contenant un phospholipide et un polyside. La proportion polyside/protéine est plus faible que dans l'antigène somatique O correspondant.

Le complexe toxique ainsi isolé et obtenu sous forme soluble a été purifié ; mais il n'a pas été possible de pousser la purification très loin sans perdre la toxicité, comme cela arrive aussi dans le cas de l'antigène O.

En outre, nous avons montré que la toxine Rough soluble ainsi obtenue est antigénique et que cet antigène soluble se retrouve dans les formes Rough de toutes les Salmonelles.

D'autre part cette toxine Rough soluble permet dans certaines conditions d'obtenir une immunité anti-toxique chez l'animal qui résiste alors aussi bien à l'endotoxine O qu'à la toxine Rough. Il existe donc un certain degré de protection croisée entre la toxine extraite des formes Rough et la toxine extraite des formes Smooth. Cette protection croisée est le seul élément commun à ces deux antigènes qui ne présentent aucune réaction croisée de précipitation.

Tous ces faits nouveaux peuvent être utilisés pour essayer d'établir une représentation hypothétique provisoire de la structure de l'antigène Rough et des antigènes O que nous exposons dans notre conclusion.

HISTORIQUE

DECOUVERTE DE LA TOXINE TYPHOÏDIQUE

Le bacille de la fièvre typhoïde fut découvert en 1880 par EBERTH et obtenu en culture en 1883 par GAFFKY. Les années suivantes, différents auteurs cherchèrent à reproduire la maladie expérimentalement : TAYON (264 - 265), FRANKEL et SIMMONDS (92). C'est en 1886, que SIROTININ (259), le premier, parle de *toxicité* du germe, toxicité que confirment bientôt BEUMER et PEIPER (16), CHANTEMESSE et WIDAL (64 - 65), BRIEGER, KITASATO et WASSERMAN (60), SANARELLI (249).

PREMIERS ESSAIS D'ISOLEMENT DE LA TOXINE.

Dès 1890, apparaissent les premiers essais de concentration de la toxine à partir des filtrats de culture : BRIEGER et FRANKEL, par précipitation alcoolique (59), de même que LEPINE et LYONNET (169) en 1898.

PFEIFFER travaillant d'abord sur le vibron cholérique (222) puis sur le bacille typhique (223) établit que la toxine de ces germes n'est pas secrétée par eux, mais qu'elle est liée aux corps bactériens ; c'est une *endotoxine*.

Alors se dessinent deux théories et se forment, si l'on peut ainsi parler, deux écoles :

- les partisans de l'exotoxine qui continuent à penser que la toxine typhoïdique est secrétée par le germe et qui cherchent à augmenter sa production dans le milieu de culture.
- les partisans de l'endotoxine qui se rangent à l'avis de PFEIFFER et chercheront bientôt à extraire la toxine directement à partir des germes.

THEORIE DE L'EXOTOXINE

CHANTEMESSE (66), RODET (246), VINCENT (270-271) se montrent convaincus que la toxine typhoïdique est une "toxine soluble" secrétée dans le milieu et ils s'attachent à son étude. LANGE (167), pour appuyer la théorie d'une toxine secrétée, en étudie la production in vivo. Il montre que l'exsudat péritonéal prélevé sur cobaye infecté au moment où il présente un tableau d'intoxication maxima, et inoculé après filtration sur bougie Berkefeld, est toxique et tue le cobaye neuf.

Mr et Mme WERNER (289) d'une part, RODET, LAGRIFFOUL et WAHBY (247) d'autre part, montrent que la sécrétion de cette toxine est favorisée dans un milieu très aéré (barbotage d'air), mais qu'il faut terminer la culture en anaérobiose car la toxine est oxydable et disparaît rapidement à l'air. D'après eux, elle est aussi thermolabile.

YAMANOUCHI (303) en 1909, YATO (304-305) en 1932 parlent eux aussi d'une toxine typhoïdique "extracellulaire thermolabile".

Nous mentionnerons encore ici, bien qu'ils ne soient pas expressément rattachés à la théorie de l'exotoxine, quelques uns des travaux les plus marquants s'attachant à préparer la toxine à partir des filtrats de culture.

IOSHIOKA (144) en 1923 précipite le filtrat de culture par le sulfate d'Ammonium et obtient une toxine soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme.

ECKER & RIMINGTON (86), en 1927, précipitent par l'acétate neutre de plomb et éliminent le plomb par le sulfate d'ammonium. La toxine obtenue contient de l'azote et des polysaccharides. Il en est de même de celle que préparent MENTEN & KING (183), en 1930, par précipitations successives à partir du filtrat de culture par l'acide acétique et par l'alcool, et de celle obtenue par GINSBURG & RIACHINA (109), en 1936, par précipitation alcoolique.

H.R. MORGAN (188), en 1940, prépare aussi la toxine à partir des filtrats de culture

sur milieu synthétique, par précipitation alcoolique, et il la purifie par précipitation acide et dialyse.

THEORIE DE L'ENDOTOXINE

MACFADYEN & ROWLAND (174 - 176) semblent être les premiers, en 1902, à extraire la toxine des germes ; ils procèdent pour cela au broyage des germes à la température de l'air liquide.

A partir de ce moment, de nombreux auteurs s'attachent au problème de l'extraction de l'endotoxine directement à partir des bactéries. Un certain nombre de techniques sont utilisées dans ce but :

- Broyage et congélation des germes : BASSENCE & MEYER (11),
- autolyse : CONRAD (72), CATHEART (63), SALIMBENI (248),
- digestion des bactéries par différents procédés : HAHN (128) par les sucs intestinaux, GOTTSTEIN (112) par la pepsine, JOBLING & BULL (148) par la leucoprotéase, DOUGLAS (81-82) en 1921 par la trypsine.

BESREDKA (15), en 1906, opère par broyage des germes avec du chlorure de sodium, suivi d'une addition d'eau distillée jusqu'à concentration physiologique. Il obtient une toxine thermostable et immunisante. Sa technique d'extraction sera reprise, par la suite, par différents auteurs : ARIMA (2) en 1912, FUKUHARA & ANDO (102) en 1913.

GRASSET & GORY (114-115) en 1927, extraient l'endotoxine typhoïdique par congélations et dégels successifs d'une suspension de germes cultivés sur gélose. Ils obtiennent un autolysat toxique, mortel à la dose de 0,4 à 0,6 mg pour la souris et 1,5 à 2 mg pour le lapin. L'autolysat est plus toxique en effectuant l'autolyse microbienne en présence de solutions peptoprotéiniques. Les auteurs ont pu détoxifier leur préparation par le formol et l'ont utilisée pour les vaccinations et la préparation de sérums thérapeutiques (116 - 117 - 119 - 121 - 122).

C'est vers la même époque, en 1930, que paraissent les importants travaux de REILLY sur la toxine typhoïdique. TEISSIER et REILLY (266) extraient la toxine des bactéries par la méthode de Besredka et remarquent l'extrême variabilité de la toxicité selon les souches utilisées, les germes isolés des malades atteints de fièvre typhoïde grave étant toujours beaucoup plus toxiques (267). Ils font ensuite une étude approfondie de l'action pathogène de la toxine (237). Inoculée à l'animal par voie veineuse, elle détermine hébété, hypothermie, dyspnée, diarrhée et la mort plus ou moins rapide. A l'autopsie, on constate congestion et nécrose hémorragique de l'estomac et de l'intestin ; les plaques de Peyer sont hypertrophiées et hémorragiques, les ganglions lymphatiques tuméfiés et hémorragiques, la rate est tuméfiée, le foie toujours atteint porte des zones de nécrose, les reins et les poumons moins régulièrement atteints portent aussi fréquemment des foyers hémorragiques et nécrotiques. REILLY et ses collaborateurs prouvent que les lésions vasculaires et hémorragiques proviennent de l'atteinte par la toxine du système sympathique abdominal : ils montrent que l'inoculation périsplanchnique de la toxine détermine ces mêmes lésions (238). Ils parviennent de plus à réaliser la fièvre typhoïde expérimentale chez un certain nombre d'animaux (singes, lapin, cobaye, chat) par inoculation dans les ganglions mésentériques de bacilles virulents (239) et à expliquer ainsi expérimentalement le mécanisme de l'évolution de la fièvre typhoïde et l'origine toxinique de toutes les lésions. Le tableau clinique de la fièvre typhoïde s'explique par une double électivité : électivité des germes pour les formations lymphoïdes du mésentère, électivité de la toxine pour le système neuro-végétatif (240). Les accidents observés chez l'homme au début du traitement de la fièvre typhoïde par la chloromycétine, dus à une libération massive de toxine par suite de la lyse brutale des germes (147 - 255), et reproduits expérimentalement sur l'animal par REILLY (241) et MOLLARET (186) apporteront par la suite une nouvelle démonstration de la nature toxinique des lésions.

BOIVIN, étudiant la constitution chimique des bactéries découvrit en 1933 (24 - 25) un constituant acidosoluble toxique chez le bacille d'Aertrycke, le bacille typhique et d'autres Salmonelles, qu'il identifia bientôt avec l'endotoxine de ces bactéries et aussi avec leur antigène somatique O bien connu des sérologistes (28-30). Cet antigène découvert par WEIL & FELIX en 1917 (287) et étudié sérologiquement en particulier par WHITE (296) et par KAUFFMANN (151 - 152) avait déjà fait l'objet de nombreux essais d'extraction des germes : KRUMWIEDE & COOPER (160), ZINSSER & PARKER (310), LANDSTEINER & FURTH (104 et 162), WHITE (300) ; mais les différentes préparations obtenues jusqu'alors, si elles précipitaient spécifiquement avec les sérums, n'étaient ni antigéniques, ni toxiques. BOIVIN, le premier, réussit à extraire, par une solution d'acide trichloracétique N/4 où elle est soluble, une substance pleinement antigénique, qu'il nomme antigène complet et il montre que cet antigène O représente le constituant essentiel de l'endotoxine typhoïdique (31 - 32).

L'endotoxine (antigène O) de BOIVIN est nettement plus toxique que les préparations de GRASSET. Inoculée par voie intra-veineuse ou intrapéritonéale, elle tue la souris avec une dose de l'ordre du dixième de milligramme ; par voie sous-cutanée, il faut des doses beaucoup plus fortes. Cette toxine est beaucoup plus toxique pour l'homme que pour l'animal ; injectées dans le derme, des doses de un à cinq microgrammes déterminent chez l'homme des réactions marquées : locales (rougeur, réactions lymphatiques et ganglionnaires), générales (fatigue, fièvre) et abdominales (troubles digestifs, nausées, vomissements, diarrhée) (observations de KOURILSKY & BOIVIN, 155).

Plusieurs auteurs : COMBIESCO & SORU (69), GIOVANARDI (110), BOIVIN (36) montrent qu'en traitant par la méthode à l'acide trichloracétique des souches de bacilles porteuses de l'antigène Vi (antigène dit de virulence, découvert par FELIX & PITT (89) en 1934, on peut en extraire aussi l'antigène Vi soluble et toxique ; cet antigène est cependant moins toxique que l'antigène O : dose mortelle pour la souris : 0,3 à 0,5, mg.

Par contre, BOIVIN ne peut extraire par cette méthode aucune substance toxique des souches en forme rough, dépourvues d'antigène O et Vi et il en conclut que l'endotoxine typhoïdique est constituée essentiellement par les antigènes O et Vi (28 et 33).

RAISTRICK & TOPLEY (228) extraient du bacille d'Aertrycke, par digestion trypsique des germes, suivie de précipitations fractionnées par l'alcool, une substance toxique et immunisante (MARTIN (179)). Ils montrent aussi que l'endotoxine ainsi obtenue correspond aux antigènes O et Vi des souches traitées (268).

IVANOVICS (146) obtient une endotoxine, très semblable à celles de Boivin et de Raistrick, par traitement des bactéries par l'acide acétique à froid (à pH = 4) suivi d'un chauffage de deux heures à 60° et de la précipitation alcoolique du filtrat.

En 1938, W.T.J. MORGAN, en collaboration avec HENDERSON (131) applique au bacille typhique la technique d'extraction qu'il a mise au point sur le bacille dysentérique de Shiga (192 - 193), l'année précédente, et il en extrait l'endotoxine par le diéthylèneglycol. Il identifie lui aussi cette endotoxine à l'antigène somatique O de la bactérie.

VAN DORN SMITH (80), d'une part, AOKI (1) d'autre part, obtiennent l'endotoxine typhoïdique simplement par chauffage prolongé (quatre heures) à 60° des germes mis en suspension soit en eau distillée (Van Dorn Smith) soit en eau physiologique.

WALKER (282) utilise pour l'extraction de la toxine une solution d'urée 2,5 M. Le filtrat contient la toxine qu'on précipite par l'alcool après dialyse.

PALMER & GERLOUGH (217) traitent d'abord les bactéries, préalablement desséchées par l'acétone, par une solution de phénol à 90 pour 100 qui est rejetée. Ils extraient ensuite la toxine des germes par l'eau physiologique ou distillée. Précipitée par l'alcool, la toxine obtenue subit une deuxième extraction phénolique puis elle est purifiée par plusieurs précipitations alcooliques. La préparation ainsi obtenue tue cinquante pour cent des souris à la dose de 0,4 mg injectée par voie intrapéritonéale.

WEGER (286), en 1947, traite les germes par une émulsion eau-phénol à chaud et obtient une préparation pyrogène et toxique, mortelle pour la souris aux doses de 0,15 à 0,30 mg.

Cette technique a été reprise récemment par WESTPHAL & LUDERITZ (290) qui obtiennent après purification, une toxine mortelle pour la souris à la dose de 0,15 mg. Ils ont ensuite fait une étude chimique approfondie de la préparation ainsi obtenue et en tirent des conclusions sur la nature chimique de la toxine (291 à 295).

NATURE CHIMIQUE DE L'ENDOTOXINE TYPHOÏDIQUE

Les toxines préparées par ces différentes méthodes sont à peu près toutes des complexes renfermant glucide, lipide et protéine ou peptide, ce dernier constituant étant en plus ou moins grande quantité selon les techniques de préparation.

Est-il possible de déterminer le constituant chimique responsable de la toxicité ? Ce constituant est-il le même, ou est-il différent de celui responsable du pouvoir antigénique ou vaccinant ? De nombreux auteurs se sont attachés à ces problèmes et ont étudié les propriétés des différentes fractions obtenues par clivage des endotoxines.

BOIVIN avait vu dès le début que son endotoxine-antigène O pouvait être clivée par hydrolyse acétique (25 et 29) mais perdait alors sa toxicité et en grande partie (52) aussi son pouvoir antigénique. La spécificité hapténique restait fixée au polyoside.

MORGAN & PARTRIDGE montrent en 1942 que l'endotoxine extraite du bacille typhique par le diéthylèneglycol est, comme l'endotoxine du bacille de Shiga (196 - 197), dissociée soit par dissolution aqueuse alcaline, soit par dissolution dans la formamide ; ils obtiennent alors par précipitation alcoolique un complexe polyoside-polypeptide toxique et antigénique, tandis que le phospholipide inactif reste en solution. Le complexe est aussi dissocié par dissolution dans le phénol à 90 pour 100. En poussant la dissociation, on arrive à séparer le polyoside, qui contient encore un élément azoté. Ce "polyoside non dégradé" reste toxique, à l'inverse du "polyoside dégradé" libéré par l'hydrolyse acide, mais il n'est plus antigénique ; cependant, on peut lui rendre ses propriétés antigéniques par copulation avec une protéine étrangère (198 - 219).

FREEMAN utilisant la technique de Morgan obtient aussi à partir de l'endotoxine de *Salmonella typhi* un "polyoside non dégradé" toxique (97) alors que le "polyoside dégradé" préparé par hydrolyse acétique, soit à partir de l'endotoxine-antigène O (95), soit directement à partir des germes (96) n'est ni toxique, ni antigénique.

La dissociation par la formamide fut appliquée aussi à l'endotoxine typhoïdique extraite selon la méthode de Boivin par l'acide trichloracétique ; celle-ci n'est pas dissociée par la

formamide neutre, mais l'est par la formamide acide (YAGI (302) et TAKEDA (261)).

KURIZUKA (161) en 1951 essaie sur l'endotoxine du bacille typhique les méthodes de fractionnement mises au point par GOEBEL (17 - 111 - 262) sur la toxine du bacille dysentérique de Flexner. L'hydrolyse acétique ou picrique douce fournit une protéine toxique, un polyside sérologiquement actif et un lipide inactif ; la protéine isolée de cette manière contient encore du polyside et du lipide. Par hydrolyse alcaline, au contraire, on obtient une protéine non toxique, un phospholipide inactif et un polyside toxique.

WESTPHAL & LUDERITZ arrivent à des conclusions toutes différentes. Ils extraient l'endotoxine typhoïdique par une émulsion eau-phénol à chaud (290). La phase aqueuse toxique contient un mélange acide nucléique - polyside. Après élimination de l'acide nucléique, il reste un complexe formé par un polyside (65 à 70 pour 100) et un composant lipidoïdique (12 à 13 pour 100). Par oxydation catalytique (eau oxygénée et catalyseur) qui démolit la partie polysidique, tandis que le lipide intact demeure fixé au reste polysidique, on conserve la toxicité (291). Le composant lipidoïdique ou "lipide A" détaché du polyside par hydrolyse chlorhydrique reste toxique. Sa toxicité, il est vrai est très atténuée, mais Westphal parvient, par copulation de ce "lipide A" avec la caséine à obtenir un complexe très toxique (295).

Ainsi d'après ces récents travaux de Westphal et Lüderitz, le constituant de l'endotoxine responsable de la toxicité ne serait ni un polyside, ni une protéine, mais un lipide. Cependant, il faut observer que le "lipide A" contient des acides aminés, ce qui semblerait indiquer la présence d'un peptide lié au lipide.

PLURALITE DES TOXINES TYPHOÏDIQUES ?.

L'endotoxine typhoïdique assimilée par les auteurs qui l'ont extraite aux antigènes somatiques O et Vi du bacille typhique, est-elle la seule toxine produite par le bacille ? En d'autres termes, existe-t-il une ou plusieurs toxines typhoïdiques ?

Cette question a été posée de longue date.

ARIMA (2) en 1912 indiquait que l'exotoxine présente dans les filtrats de culture, conférait à l'animal une immunité anti-exotoxique mais n'immunisait pas contre l'endotoxine extraite des corps bactériens.

VINCENT (272) en 1915 affirmait aussi qu'il existe deux toxines typhoïdiques.

IOSHIOKA (145) en 1923, extrayant la toxine du filtrat de culture par précipitation par le sulfate d'ammonium, indique que la toxine obtenue renferme deux éléments toxiques distincts : un élément instable disparaissant rapidement et thermolabile, un élément stable se conservant plus longtemps et résistant au chauffage.

REILLY et ses collaborateurs (237) en 1933, constatant les différences lésionnelles présentées par les toxines extraites de diverses souches, certaines lésions prédominant avec certains échantillons de toxine et faisant totalement défaut avec d'autres, s'étaient posé la question : le produit désigné sous le nom d'endotoxine typhoïdique ne renfermerait-il pas plusieurs toxines distinctes ? D'autre part, observant que les souris étaient moins sensibles que les lapins à l'endotoxine extraite des germes, et au contraire plus sensibles à la toxicité des filtrats de culture, Reilly émettait l'hypothèse que les filtrats de culture de certaines souches contiendraient des produits exocellulaires toxiques.

VINCENT en 1942 (273 à 280) affirme qu'il a isolé deux toxines typhoïdiques bien distinctes : la neurotoxine ou exotoxine neurotrope, non encore décrite et l'entérotoxine seule connue jusqu'alors. Il prépare ces deux toxines dans des conditions très particulières : le bacille typhique provenant d'une souche récemment isolée du malade est cultivé en bouillon dans un sac de collodion inséré dans le péritoine d'un cobaye. Après plusieurs passages de cobaye à cobaye, la souche a acquis une plus grande toxicité. La culture obtenue est filtrée, ou mieux centrifugée énergiquement. Le surnageant inoculé au lapin provoque une torpeur complète de l'animal et sa mort en 8 à 18 heures sans aucun symptôme intestinal. L'autopsie ne révèle aucune lésion intestinale. Si on prolonge la durée de culture en sac au delà du sixième jour, on constate en inoculant le filtrat la disparition des symptômes nerveux et l'apparition des symptômes intestinaux, en particulier la diarrhée. La neurotoxine a disparu et a fait place à l'entérotoxine d'apparition plus tardive. Cette neurotoxine se montre d'une étude difficile en raison de sa grande fragilité : elle est oxydable et s'altère rapidement à l'air ; elle est thermolabile et détruite par chauffage à 58°. De plus tous les germes ne sont pas capables d'en produire, même in vivo et ceux qui en produisent in vivo n'en fournissent plus dès qu'on les cultive in vitro. Ces deux toxines sont immunisantes ; elles confèrent à l'animal une immunité antitoxique, mais de façon indépendante : la neurotoxine ne protège pas contre l'entérotoxine et réciproquement l'entérotoxine ne protège pas contre la neurotoxine (274 - 276). Vincent note que les symptômes de ces deux toxines sont très spécifiques de chacune d'elle. La neurotoxine donne toujours les symptômes nerveux, quelle que soit la voie d'inoculation (sous-cutanée, intrapéritonéale ou intracrânienne) (277). La toxine entérotrope donne toujours les mêmes signes intestinaux, même par inoculation intracrânienne (280). Ces résultats sont en désaccord avec ceux de TARDIEU et de POURSIDES & GREBUS. TARDIEU (263) par inoculation de l'endotoxine de Bolvin dans les ventricules obtient chez le chien un typhus absolument typique. POURSIDES & GREBUS (227) par inoculation intracrânienne de cette même toxine (extraite du bacille d'Eberth par l'acide trichloracétique) observent la mort de l'animal par syncope.

MUTERMILCH (200 - 201) en 1946 obtient des filtrats de culture (après cinq ou six jours de culture) capables de tuer le lapin en quelques heures avec des symptômes nerveux : prostration générale. Cette toxine provoque une leucopénie accentuée, accompagnée de lymphocytose (disparition presque totale des polynucléaires du sang circulant, qui s'expliquerait par l'action lytique de la toxine observée in vitro (202)). La leucopénie constitue un test très sensible qui permet à Mutermilch de déceler l'apparition de la toxine dès la sixième heure de culture. De cette formation précoce dans le milieu de culture et du fait qu'il a réussi à la détoxifier par le formol (203), Mutermilch déduit que la toxine obtenue est une exotoxine. Il faut pourtant noter que FRAPPIER & SHERMANN (93 - 94) ont montré qu'on peut aussi déceler l'apparition de l'antigène O dès la sixième heure dans les filtrats de culture.

RAYNAUD (230) en 1946 cultive la souche H 901 de *Salmonella typhi* en anaérobiose stricte. Le filtrat de culture est toxique pour les souris, les cobayes, et les lapins. L'injection de cette toxine provoque un état de somnolence et de torpeur de plus en plus profonde entraînant la mort de l'animal en 24 à 48 heures sans symptômes intestinaux et en particulier sans diarrhée. Ce tableau différent de celui provoqué par l'endotoxine de la souche H 901 ex-traite des germes par l'acide trichloracétique, selon la méthode de Bolvin, se rapproche de celui décrit par Vincent avec sa neurotoxine. La toxicité du filtrat de culture obtenu dans ces conditions se montre maxima au quatrième ou cinquième jour de culture. Elle disparaît souvent dès le sixième ou huitième jour, quand la culture est faite en anaérobiose relative (ballon de bouillon V.F. glucosé désaéré par ébullition avant ensemencement) et se conserve au contraire pendant vingt jours si la culture est gardée en tubes scellés. La toxine est très labile, elle s'altère très rapidement à la température ordinaire. Elle est immunisante (231) ; le sérum des lapins immunisés protège la souris contre l'inoculation de la toxine. Cette toxine paraît semblable à la neurotoxine de Vincent, cependant on observe aussi parfois chez l'animal une diarrhée transitoire et il est impossible d'apporter la preuve de l'existence d'une toxine différente de l'endotoxine classique par la simple analyse clinique des symptômes présentés par l'animal. Il faudrait pouvoir l'isoler chimiquement, mais cela s'avère difficile en raison de sa fragilité. Les essais entrepris pour séparer par voie chimique, à partir de ces filtrats de culture du bacille d'Eberth cultivé en anaérobiose, une toxine indépendante de l'endotoxine O, sont restés négatifs.

TRAVAIL PERSONNEL

Pour établir l'existence d'une toxine différente des antigènes O et Vi, il restait la possibilité de la rechercher chez des souches de bacilles typhiques dépourvues de ces antigènes, autrement dit chez des souches en forme rough. C'est ce que nous avons fait. Notre hypothèse de travail était que si le bacille d'Eberth élaborait une toxine distincte des antigènes O et Vi, les souches rough la produisaient probablement aussi bien que les souches smooth, comme le fait a été observé avec le bacille dysentérique (*Shigella dysenteriae*) (34 - 35).

Bien que l'opinion générale considère les souches rough avirulentes comme non pathogènes et non toxiques, plusieurs auteurs avaient cependant déjà noté que les souches en forme rough sont toxiques :

WHITE (296) en 1926, a indiqué que certaines souches rough sont toxiques et il a constaté en 1929 (299) que les germes rough après avoir été traités par l'alcool ont une toxicité aussi grande et parfois plus grande que celle des germes smooth.

GOYLE (113), IBRAHAM & SCHUTZE (139), MALTANER (178) ont également noté la toxicité des formes rough.

BOIVIN en 1935 (31 - 32) a constaté aussi que les germes rough possèdent une toxine, mais celle-ci n'est pas acidosoluble et il n'a pas pu l'extraire des germes par sa méthode à l'acide trichloracétique (28 - 33).

HENDERSON en 1939 (133) a obtenu un extrait toxique en traitant les germes rough par le diéthylèneglycol, mais la toxicité de cet extrait était très faible (une petite proportion des animaux inoculés mourait).

MACKENZIE, PICKE & SWINNEY en 1940 (177) ont obtenu aussi un extrait toxique et antigénique de germes typhiques rough en utilisant le procédé d'extraction de Raistrick et Topley, digestion des germes par la trypsine, mais là aussi, la toxicité était très faible et irrégulière ; il fallait au moins 2,5 mg pour tuer la souris. Ces auteurs n'ont pas poussé plus loin leurs recherches.

Nous avons constaté à notre tour que les formes rough contiennent aussi une toxine. Cette toxine est-elle la même que celle des formes smooth ou en diffère-t-elle et de quelle

manière ? N'existe-t-il pas un principe toxique unique, commun aux deux formes smooth et rough, mais lié, peut-être chimiquement à des complexes antigéniques différents ?

A notre connaissance, aucune recherche approfondie n'a été faite sur la toxine des formes rough. C'est à cette étude que nous avons consacré ce travail : nous apportons ici les résultats que nous avons obtenus.

SOUCHE ETUDIEE

Nous avons utilisé la souche de *Salmonella typhi* R2 provenant du Centre des Salmonelles de l'Institut Pasteur.

Caractères de la souche R 2

Cette souche présente bien les caractères des formes rough : nous les avons tous vérifiés :

- Caractères culturels (ARKWRIGHT 3 et 4) et biochimiques

Les colonies obtenues sur gélose, au lieu d'être bombées, lisses et bien rondes, sont plates, présentent une surface rugueuse, plissée et des bords dentelés.

Cultivés en bouillon, les germes se rassemblent en grumeaux et se déposent au fond du tube. Le bouillon, au lieu de présenter un trouble homogène reste limpide.

- Agglutination spontanée des germes par l'eau physiologique (NaCl 8,5 pour 1.000) ARKWRIGHT (4) WHITE (297 - 298) SCHOLTENS (251)). Alors que les bactéries smooth forment des suspensions homogènes en eau physiologique, les bactéries rough sont rapidement agglutinées.

- Précipitation par le réactif de Millon (WHITE (299)). Les suspensions de germes rough traitées par le réactif de Millon à chaud donnent un précipité rouge immédiat (136). Les bactéries smooth ne donnent pas de précipité coloré.

- Précipitation par une solution de trypaflavine à 2 pour 1.000 acidifiée (réaction de PAMPANA (218)). Cette réaction n'est spécifique des germes rough qu'à condition d'utiliser une solution légèrement acide : les germes à antigène Vi sont comme les germes rough précipités par une solution neutre de trypaflavine, mais il ne le sont plus avec une solution acide (137.)

- Absence d'antigène O et Vi extractibles. Traitées par la technique de Boivin à l'acide trichloracétique, les bactéries de la souche R2 donnent des extraits limpides, non opalescents, dépourvus de toxicité (l'injection de 5 mg de substance sèche ne cause aucun trouble à la souris) et ne précipitant pas avec les sérums anti-antigène O et anti-antigène Vi, préparés soit avec les corps bactériens porteurs de ces antigènes, soit avec ces antigènes solubles.

- Absence d'antigènes O et Vi décelables par immunisation. Les lapins immunisés par des suspensions de germes de la souche R2 fournissent un sérum contenant des agglutinines actives contre l'antigène flagellaire H (d) spécifique du bacille d'Eberth, et des agglutinines actives contre les corps bactériens R 2 chauffés (antigène somatique R) ; mais ces sérums ne contiennent pas d'agglutinines anti O ou anti Vi.

La souche R 2 est donc bien dépourvue d'antigène O et d'antigène Vi. Elle contient l'antigène flagellaire H (d) et l'antigène somatique rough.

Toxicité de la souche R 2

Les filtrats de culture en bouillon viande-foie non glucosé contiennent une substance toxique provoquant chez le lapin des accidents nerveux (torpeur, somnolence, coma) et parfois, mais de façon irrégulière, des accidents intestinaux (diarrhée). La dose minima mortelle de ces filtrats est cependant élevée : 5 à 10 ml pour le lapin en injection intraveineuse.

Les corps bactériens cultivés soit en bouillon, soit sur gélose, recueillis et lavés renferment la même toxine que les filtrats de culture. La dose minima mortelle des germes varie d'une préparation à l'autre (1 à 4 mg). Elle est en moyenne de deux milligrammes de germes secs pour la souris blanche de vingt grammes, en inoculation intrapéritonéale.

Nous avons cherché à augmenter la toxicité de la souche R 2 (soit toxicité des filtrats de culture, soit toxicité des corps bactériens) en modifiant les conditions de culture : adjonction de sérum au bouillon de culture, modification du pH du milieu, utilisation de milieux de culture privés de fer ou en contenant des quantités déterminées. Tous nos essais sont restés négatifs.

La toxine, que nous avons appelée toxine R 2, a été extraite des corps bactériens et nous en avons étudié les propriétés physico-chimiques, biologiques et immunologiques.

Plan du travail

Nous avons divisé cet exposé en trois parties.

Dans la première, nous exposerons les méthodes utilisées pour la préparation et la purification de la toxine R 2.

La deuxième partie traitera de son étude physico-chimique.

La troisième, nettement plus importante, sera consacrée à l'étude des propriétés biologiques et immunologiques. Elle comprendra trois chapitres :

- Toxicité
- Pouvoir antigénique
- Pouvoir vaccinant

Nous étudierons en conclusion les rapports de cette toxine extraite d'une forme rough de *Salmonella typhi*, avec l'endotoxine classique des formes smooth des Salmonelles.

PREMIERE PARTIE

PREPARATION DE LA TOXINE R2

- PRODUCTION DES GERMES

Les bactéries ont été obtenues par culture en boîtes de Roux sur bouillon gélosé pendant vingt-quatre à quarante-huit heures à 37°. Elles sont récoltées en eau physiologique. La suspension de récolte est filtrée sur gaze pour éliminer les débris de gélose, puis centrifugée. Les germes sont ensuite lavés une ou deux fois à l'eau physiologique refroidie à 0°.

La production des germes varie selon les lots de préparation ; une boîte de Roux fournit en moyenne 600 à 1.000 Milliards de germes pesant à l'état sec 120 à 160 milligrammes. Le nombre de germes a été déterminé par la mesure des densités optiques de suspensions diluées soit au photomètre de Meunier (écran bleu ou vert), soit au photomètre de Klett-Summerson (écran vert n° 54), puis référence à la courbe donnant le nombre de germes en fonction de la densité optique, établie au moyen de suspension de germes numérotées à la cellule.

Dans la plupart de nos préparations, les germes lavés ont été utilisés frais ; dans certaines de nos préparations, les germes ont été desséchés par trois lavages à l'acétone (faits à - 15°) et par lyophilisation. Il y a intérêt à opérer sur les germes frais, les résultats étant plus réguliers et généralement meilleurs.

- EXTRACTION DE LA TOXINE DES GERMES

Nous avons étudié plusieurs méthodes d'extraction et avons recherché celle qui permettait d'extraire la plus grande quantité de toxine. Pour faciliter la comparaison de ces différentes techniques, nous avons calculé à partir des résultats obtenus dans nos différents essais, la quantité de toxine extraite à partir d'une même quantité de bactéries. La quantité de toxine est exprimée par le nombre de doses minima mortelles contenues dans l'extrait provenant du traitement de 1 gramme de germes secs. Cette quantité de corps bactériens entiers représente en moyenne environ 500 doses minima mortelles pour la souris (dose tuant 100 % des animaux).

A partir de cette quantité de 1 gramme de germes secs :

- la simple autolyse des germes en eau physiologique, additionnée de sulfate d'oxyquinoléine à 1 pour 1.000 a permis d'extraire environ 50 doses minima mortelles (DMM).
- une solution 3 M de glyocolle, ajustée à pH = 7,0 a extrait 160 doses minima mortelles.
- le traitement d'une suspension de germes en eau distillée par les ultra-sons (BOSCO (56), RAYNAUD (235)) a fourni environ 80 doses minima mortelles.
- l'agitation pendant trois jours à 37° des bactéries mises en suspension dans une solution M/15 de tampon phosphate de pH = 8,5 (technique inspirée de HOSOYA (138), a donné environ 40 doses minima mortelles.
- la digestion des germes par une préparation commerciale de trypsine, puis par la phosphatase alcaline, suivie de déprotéinisation selon SEVAG a permis d'obtenir 130 doses minima mortelles.
- la solution hypertonique (chlorure de sodium - citrate de sodium) utilisée par M. RAYNAUD pour l'extraction des toxines de *Plectridium tetani*, de *Clostridium Sordelli*, de *Clostridium Botulinum* (232 à 234) a permis d'extraire 250 doses minima mortelles.

Plusieurs expériences comparatives entre cette dernière méthode et l'une ou l'autre des précédentes ont été à l'avantage de cette dernière. C'est cette technique que nous avons adoptée.

Technique -

Les germes sont mis en suspension dans une solution M en chlorure de sodium et M/10 en Citrate de sodium à raison de trois à cinq millilitres de solution pour la quantité de germes provenant de la culture d'une boîte de Roux, soit environ 25 à 30 g de germes secs pour un litre de solution hypertonique. Les suspensions ainsi obtenues contiennent en moyenne 4 à 5 mg d'azote total par millilitre. Après un séjour de un à quatre jours en glacière à 0° + 4°, la suspension est centrifugée. Le surnageant est conservé, le culot de germes est extrait une deuxième fois dans les mêmes conditions par un volume de solution hypertonique égal à la moitié de celui utilisé pour la première extraction. Les deux extraits successifs ainsi préparés sont mélangés et constituent ce que nous appelons "l'extrait hypertonique".

- PREPARATIONS BRUTES DE TOXINE - EXTRAIT BRUT -

L'extrait hypertonique est dialysé contre eau distillée à la glacière (0° + 4°) pour éliminer le chlorure et le citrate de sodium. Il y a en même temps élimination d'impuretés azotées, constatée par une grosse diminution des taux d'azote des extraits après dialyse. La dialyse doit être faite en sacs de cellophane, plusieurs essais en sacs de viscose ont provoqué une grosse perte de toxicité. La durée de dialyse est de quatre à cinq jours.

Après sortie des sacs de dialyse, le liquide est centrifugé longuement : quarante à cinquante minutes à 3.000 tours/minute à 0°, pour éliminer les débris bactériens qui auraient pu rester dans l'extrait hypertonique.

La solution obtenue constitue ce que nous appelons "l'Extrait Brut ou préparation B". La concentration de la solution est déterminée par pesée après dessiccation à poids constant à 110° d'un volume exactement mesuré. On en déduit le poids total de substance sèche obtenue.

Les rendements de préparation de l'extrait brut varient en moyenne entre 4 et 7 pour 100 du poids de germes traités et entre 25 et 50 pour 100 de la toxicité initiale des bactéries.

La solution d'extrait brut est généralement limpide, non opalescente ou très peu, mais ce caractère est en rapport avec la faible concentration de la solution (environ 0,2 à 0,3 pour 100). Lorsque nous avons réalisé des concentrations plus fortes, par lyophilisation de l'extrait brut et redissolution de substance sèche dans l'eau distillée, nous avons obtenu des solutions opalescentes.

Tableau 1
TOXICITE DES EXTRAITS BRUTS

N°	D M M en ml.	D M M en mg.	D M M en mg d'azote	N°	D M M en ml.	D M M en mg.	D M M en mg d'azote
7	0,1	0,30	0,036	3.005	0,2	-	0,012
8	0,2	0,40	0,034	3.085	0,1	0,14	0,019
9	0,1	0,34	0,014	3.130	0,1	-	0,013
10	0,1	0,31	0,018	3.132	0,1	0,13	0,016
11	0,1	0,36	0,015	4.010	0,2	-	0,078
12	0,4	1	0,073	4.012	0,4	0,52	0,060
13	0,3	0,75	0,054	4.040	0,2	0,36	0,020
14	0,3	1,08	0,054	4.062	0,4	-	0,045
15	0,3	0,75	0,051	4.064	0,2	-	0,026
16	0,3	0,90	0,117	8.032	1,5	1,98	0,150
118	0,1	-	0,038	8.050	1,6	2,4	0,188
131	0,1	-	0,056	8.110	0,8	0,80	0,101
3004	0,1	-	0,011	8.200	0,4	0,80	0,072

Les caractéristiques de l'extrait brut sont assez variables suivant les lots de préparation. Nous donnons dans le tableau 1 les toxicités d'un certain nombre d'échantillons, exprimées en doses minima mortelles pour la souris (doses tuant 100 pour 100 des animaux). On constate de grandes différences (0,13 à 2,4 mg). Pour certains de ces extraits (N° 12 à 16), nous avons observé que le poids élevé de la dose minima mortelle provenait de ce que la dialyse avait été faite en sacs de viscosse et non en sacs de cellophane, ce qui avait entraîné une perte importante de toxicité. Pour nos dernières préparations, nous avons enregistré une forte baisse de toxicité, dont nous n'avons pas pu déterminer la cause (perte de toxicité de la souche ?.. légère variation du milieu ?..).

La solution d'extrait brut se conserve mal, même à basse température, la toxicité diminuant en même temps qu'apparaît un précipité.

Les sérums de lapin préparés avec ces solutions brutes de toxine, et les réactions sérologiques diverses que nous avons faites montrent que l'extrait brut contient l'antigène flagellaire H(d) et l'antigène somatique rough. L'étude détaillée en sera faite dans la troisième partie.

- PRECIPITATION TRICHLORACETIQUE - PREPARATION T.

L'extrait hypertonique, non dialysé, est additionné d'un tiers de son volume de solution normale d'acide trichloracétique, de façon à obtenir une concentration N/4 en acide. Dans ces conditions, il se forme un précipité abondant, qui est régulièrement toxique, si on a soin d'opérer à froid (0°). La durée du maintien à pH acide doit être aussi courte que possible, en général, il suffit d'un contact de une demi-heure à une heure. Le précipité séparé par centrifugation est insoluble dans l'eau distillée, il se dissout lentement dans les solutions alcalines. Nous avons utilisé pour cette redissolution différentes solutions salines sous un volume égal au dixième du volume initial d'extrait hypertonique, pour réaliser en même temps une concentration de la substance toxique (solution de phosphate de soude M/15 de pH = 7,6 - solution de carbonate de soude à 10 pour 100). Il reste toujours un insoluble, peu ou pas toxique, qu'on élimine par centrifugation. Le précipité se dissout bien dans la soude en solution déclinormale, mais la toxicité est moins régulière. La solution est ensuite dialysée contre tampon phosphate M/50 de pH = 7,6 additionné de chlorure de sodium 8,77 pour 1.000.

On obtient ainsi une solution toxique que nous appelons "préparation T". Celle-ci est fortement opalescente.

Tableau 2
TOXICITES COMPAREES DES EXTRAITS BRUTS
ET DES PREPARATIONS T

EXTRAITS BRUTS				PREPARATIONS T CORRESPONDANTES			
N°	D M M en ml.	D M M en mg.	D M M en mg. d'azote	N°	D M M en ml. ⁽¹⁾	D M M en mg.	D M M en mg. d'azote
16	0,3	0,90	0,117	2.109	0,03	-	0,067
131	0,1	-	0,056	2.140	0,03	0,22	0,028
3004	0,1	-	0,011	3.050	0,02	-	0,020
3085	0,1	0,14	0,019	3.102	0,04	-	0,046
3085	0,1	0,14	0,019	3.110	0,02	-	0,016

(1) La préparation T est concentrée 10 fois en volume par rapport à l'extrait brut.

Si on compare (tableau 2) les toxicités des préparations T et des extraits bruts correspondants, on constate que le rendement de l'opération en toxicité est assez irrégulier. Il varie de 25 à 100 pour 100. D'autre part, la dose minima mortelle exprimée en milligrammes d'azote, se montre parfois plus forte dans la préparation T que dans l'extrait Brut ; ceci implique soit une plus grande concentration d'impuretés azotées, soit une dénaturation de la toxine.

Ces préparations T sont très instables en solution ; par conservation à 0°, elles se troublent ; le précipité qui apparaît devient de plus en plus important et la toxicité disparaît progressivement.

Nous avons alors cherché un procédé moins brutal de précipitation, en opérant en parti-

culier à un pH moins bas (le pH de la précipitation trichloracétique varie de 1,6 à 1,9). D'autres acides essayés, acide acétique, acide chlorhydrique ne nous ont pas donné de précipitation satisfaisante à partir de l'extrait hypertonique. Par contre, en opérant avec l'acide acétique sur l'extrait brut (extrait dialysé), on obtient une bonne précipitation.

- PRECIPITATION ACETIQUE - PREPARATION P 1.

En ajoutant à l'extrait brut à 0° une quantité d'acide acétique suffisante pour amener le pH à 4,0 - 4,1, on obtient un précipité toxique. Ce précipité, séparé par centrifugation, est insoluble dans l'eau distillée. On peut le redissoudre dans les mêmes conditions que celui obtenu par la précipitation trichloracétique. Nous avons obtenu de meilleurs résultats en opérant de la manière suivante : le précipité est mis en suspension dans une solution d'acétate de soude 0,150 M de pH = 6,9 ou dans une solution de phosphate de soude M/50 de pH = 7,6. Bien que ces solutions soient tamponnées, le pH est fortement abaissé par l'addition du précipité, ce qui empêche la dissolution de celui-ci. On ajoute avec précaution de la soude, en solution décimale, pour ramener le pH à une valeur voisine de 7,0 et assurer la dissolution du précipité. La solution, préparation **P1**, est ensuite utilisée telle quelle, ou dialysée contre un tampon identique. Lorsque ces préparations **P1** ont été utilisées par la suite pour des purifications ultérieures, le précipité, au lieu d'être redissous a été simplement mis en suspension dans de l'eau distillée et lyophilisé.

Les rendements en toxicité de la précipitation acétique de la toxine à pH = 4,1 sont nettement plus réguliers et meilleurs que ceux de la précipitation trichloracétique précédente. De plus, on observe toujours une purification appréciable de la toxine ; la dose minima mortelle exprimée en milligrammes de poids sec est deux à six fois plus faible que celle de l'extrait brut correspondant (tableau 3). On remarque que la dose minima mortelle exprimée en milligrammes d'azote est aussi très abaissée plus encore que celle donnée en poids sec en général, ce qui suppose l'élimination de protéines étrangères à la toxine.

Tableau 3
TOXICITES COMPAREES DES EXTRAITS BRUTS
ET DES PREPARATIONS P 1

EXTRAITS BRUTS				PREPARATIONS P 1 CORRESPONDANTES			
N°	D M M en ml.	D M M en mg.	D M M en mg. d'azote	N°	D M M en ml. ⁽¹⁾	D M M en mg.	D M M en mg. d'azote
4.012	0,4	0,52	0,060	4.032	0,02	-	0,016
4.012	0,4	0,52	0,060	4.035 A	0,05	0,25	0,026
4.012	0,4	0,52	0,060	4.035 P	0,01	0,13	0,007
4.012	0,4	0,52	0,060	4.050 A	0,01	0,08	0,008
4.012	0,4	0,52	0,060	4.050 P	0,01	0,10	0,008
4.040	0,2	0,36	0,020	4.040	0,02	-	0,011
4.062	0,4	-	0,045	4.072	0,02	0,18	0,012
4.064	0,2	-	0,026	4.092	0,01	0,11	0,008

(1) La préparation P1 est concentrée 10 fois en volume par rapport à l'extrait brut.

Les caractéristiques de quelques unes de nos préparations P 1 lyophilisées sont indiquées dans le tableau 7 page 18. On voit que les toxicités sont moins régulières et plus faibles que les précédentes ; ceci doit tenir en grande partie à la faible toxicité des préparations brutes correspondantes, que nous avons signalée plus haut.

La précipitation de la toxine par l'acide acétique n'est pas toujours complète. Le surnageant reste parfois toxique. En l'additionnant d'un demi volume d'alcool, il se forme en 12 heures à - 5° un précipité **P2** qui est toxique ; mais il n'est pas plus soluble dans l'eau que le précipité P1. La toxicité de ce produit P2 étant assez irrégulière, nous n'avons pas continué à le préparer.

- DIVERS ESSAIS DE PURIFICATION DE LA PREPARATION P 1

Nous avons essayé de purifier nos préparations de toxine par adsorption ; plusieurs adsorbants ont été essayés : gel d'alumine, alun de potassium, phosphate d'alumine. Nous avons pu obtenir une bonne adsorption de la toxine sur le phosphate d'alumine à pH = 5,0 - 5,5, mais nous n'avons pas réussi à l'éluer de façon satisfaisante.

Nous avons ensuite tenté de fractionner par voie chimique ; différents procédés ont été mis en oeuvre :

- Précipitations acides fractionnées (courbe de relargage en fonction du pH, de pH = 7,0 à pH = 3,0) ; pratiquement tout précipite à pH = 4,0 - 4,5.
- Précipitations par les solutions concentrées de phosphate de potassium, préparées selon BUTTLER et MONTGOMERY (61). La toxine précipite pour les concentrations de 1,35 M à 1,50 M.
- Précipitations fractionnées par l'alcool éthylique à différentes concentrations et à différentes valeurs du pH. En opérant en tampon acétate de soude de pH = 5,7, la toxine précipite à la concentration de 33 pour 100 d'alcool éthylique.
- Précipitations fractionnées par l'acétone.

Malgré un très grand nombre d'expériences, nos résultats ont été négatifs : les fractions obtenues présentaient une toxicité souvent beaucoup plus faible que les produits de départ et elles n'étaient que très partiellement purifiées.

Nous avons alors essayé d'isoler la fraction toxique par digestions protéolytique et phosphatasique.

- DIGESTIONS PROTEOLYTIQUE ET PHOSPHATASIQUE

Les préparations toxiques ont d'abord été soumises à une digestion protéolytique par une préparation commerciale de trypsine (trypsine Vaillant) ; elles ont ensuite subi une digestion phosphatasique selon la technique utilisée par TAL et GOEBEL (262).

La phosphatase alcaline utilisée a été préparée à partir de muqueuse intestinale de chien par digestion tryptique selon SCHMIDT et THANNHAUSER (250). Le produit soluble obtenu après digestion tryptique et élimination du résidu insoluble, a été employé sans purification ultérieure. Son activité a été déterminée sur glycérophosphate de sodium dans les conditions recommandées par ROCHE et coll. (245). Les préparations que nous avons utilisées contenaient, la première 49 unités, la deuxième 40 unités par ml.

Nous avons effectué ces digestions protéolytique et phosphatasique sur des préparations P1 et P2. La technique est la suivante :

Technique :

Troisgrammes de produit (P1 ou P2) sont mis en suspension dans 100 ml de tampon Borate M/10 de pH = 7,9 et additionnés de 100 mg d'une préparation brute de trypsine (Vaillant). La suspension est dialysée sous toluène à 37° en sac de cellophane avec agitation, contre 2 litres de tampon borate identique, que l'on change tous les jours. On constate que le liquide extérieur au sac contient des substances donnant une réaction à la ninhydrine positive. Après cinq jours de ce traitement, le sac de cellophane est ouvert. On ajoute 5 ml d'une solution de phosphatase alcaline d'intestin de chien et on dialyse, sous toluène, à 37°, pendant 24 heures, contre 2 litres de tampon borate M/10 de pH = 8,6. On constate qu'il passe dans le liquide extérieur du phosphate minéral que l'on dose. On trouve ainsi que 10 à 14 pour 100 du phosphore total du produit (P1 ou P2) a traversé la membrane du sac de dialyse. On déprotéinise ensuite selon Sevag par quinze agitations successives faites à 0° avec le mélange chloroforme-alcool isoamylique (4/1). On emploie chaque fois un volume de mélange chloroforme-alcool isoamylique égal à un quart du volume de la phase aqueuse. L'opération s'accompagne d'une perte assez importante sur le volume de cette dernière par suite des décantations. Les produits qui restent dans la phase aqueuse résiduelle sont débarrassés du chloroforme par dialyse à 0° pendant quarante-huit heures avec agitation et recueillis par lyophilisation. On obtient 300 à 400 mg de produit pour les bonnes préparations.

Nous appelons **P3** le produit obtenu à partir de la préparation P1, et **P4** le produit obtenu à partir de la préparation P2. Nous donnons dans le tableau 4 la toxicité de ces produits P3 et P4 comparativement à celle des produits P1 et P2 correspondants. On constate que les doses minima mortelles exprimées en poids sec sont du même ordre (l'une est même augmentée) ; cependant si on compare les doses minima mortelles exprimées en milligrammes d'azote, on voit qu'elles sont abaissées par cette opération. Quoiqu'il en soit, la purification obtenue paraît faible.

Le gros intérêt de cette préparation réside dans les résultats de l'étude immunologique. Les produits P3 et P4 sont en effet dépourvus d'antigène H (d), tout en étant toxiques, ce qui prouve l'indépendance de la toxine par rapport à l'antigène flagellaire. Nous y reviendrons plus loin. De plus ces produits P3 et P4 sont bien solubles dans l'eau, à l'inverse des préparations précédentes.

Cependant les digestions protéolytique et phosphatasique suivies de déprotéinisation selon Sevag constituent des temps opératoires délicats qui entraînent des pertes de matériel parfois considérables, si bien qu'il n'était pas possible d'envisager de préparer par cette technique la quantité relativement élevée de toxine nécessaire à l'étude de ses propriétés.

Tableau 4

TOXICITES COMPAREES DES PREPARATIONS

P_1 et P_3
 P_2 et P_4

N°	AVANT DIGESTIONS PROTEOLYTIQUE ET PHOSPHATASIQUE				APRES DIGESTIONS PROTEOLYTIQUE ET PHOSPHATASIQUE			
		D M M en mg.	D M M en mg. d'azote	D M 50 en mg.		D M M en mg.	D M M en mg. d'azote	D M 50 en mg.
4.123	P_1	1	0,101	0,25	P_3	1	0,058	0,18
4.123	P_2	0,25	0,029	0,12	P_4	0,50	0,021	0,25
4.193	P_1	0,55	0,058	-	P_3	0,40	0,020	0,20

D'autre part, les produits P_3 et P_4 bien que solubles au moment de leur préparation, devenaient par conservation, après lyophilisation de plus en plus difficiles à dissoudre. Cette insolubilité, témoin d'une transformation lente, s'accompagne d'une baisse appréciable de toxicité et rend difficile l'étude des propriétés biologiques de la toxine.

C'est pourquoi nous avons cherché une autre technique de préparation. Nous avons essayé divers types de dégradation de la préparation toxique P_1 .

ESSAIS DE DISSOCIATION DE LA PREPARATION P_1

- 1° - HYDROLYSE ACIDE

Un poids connu de P_1 (100 mg) est mis en suspension dans 10 ml d'acide acétique en solution normale. On ajoute 1 g de chlorure de sodium. Le pH est égal à 3,2. On porte à 100° pendant une heure, on refroidit et on centrifuge. Le surnageant subit ensuite une extraction par l'éther et la fraction hydrosoluble est précipitée par quatre volume d'alcool. Les différentes fractions sont étudiées.

L'opération peut être résumée par le schéma suivant :

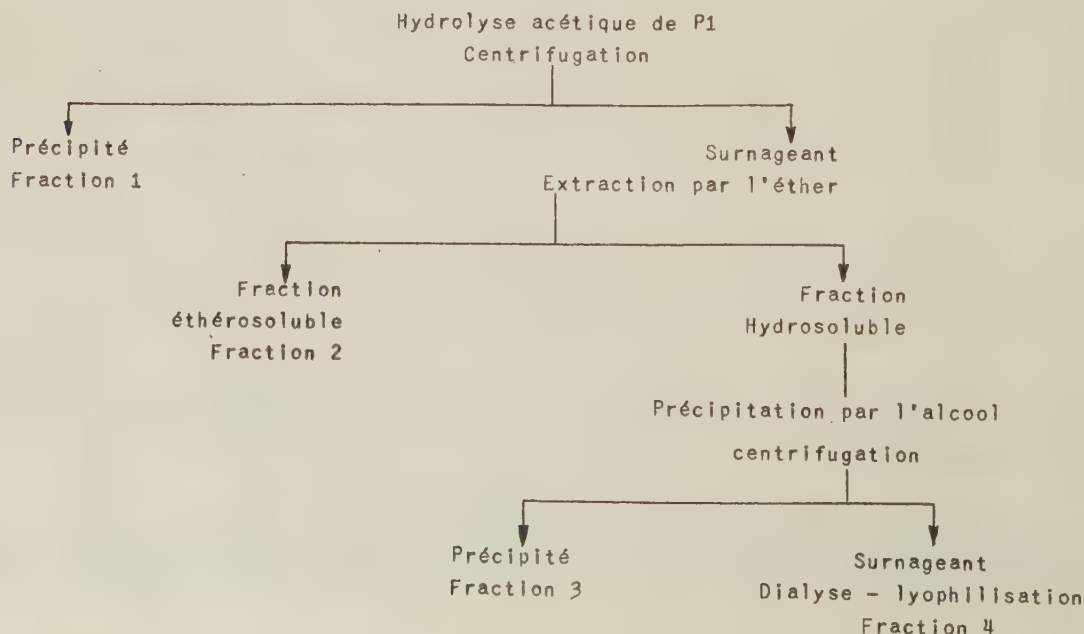


Tableau 5
**PROPRIETES DES QUATRE FRACTIONS OBTENUES
 PAR HYDROLYSE ACIDE**
 de la préparation toxique P₁

N° des Fractions	Toxicité D M M en mg.	COMPOSITION CHIMIQUE			Solubilité dans l'eau	% du produit initial
		Azote	Phosphore	Glucides		
1	> 2,5	6,56	0,26	3,8	Insoluble	40
2	non toxique	-	-	-	Insoluble	10
3	± 2,5	0,12	-	6,95	difficilement soluble	50
4	non toxique	-	-	-	peu soluble	-

La composition chimique est indiquée en %
 Les glucides sont exprimés en glucose.

Les propriétés des quatre fractions obtenues sont rapportées dans le tableau 5. La toxicité passe dans la fraction 3 ; cette dernière ne peut être solubilisée que difficilement dans l'eau distillée ou dans les solutions tampons de pH = 7,0 - 7,4. De plus la toxicité a baissé considérablement, si bien que ce procédé de dissociation n'a pu être retenu pour l'étude ultérieure.

La dégradation acide essayée suivant de nombreuses modalités différant de la précédente par la concentration et la nature de l'acide utilisé et par la durée et la température (60° et 100°) de l'hydrolyse a toujours conduit à des résultats analogues

- 2° - HYDROLYSE ALCALINE

Divers essais d'hydrolyse alcaline du P₁ à 50° ou à 25° ne nous ont donné que des résultats négatifs. Les fractions obtenues ne présentaient qu'une toxicité faible ou nulle.

La seule méthode qui nous ait permis d'obtenir un produit toxique fut la dissociation de P₁ en solution alcaline avec séparation par précipitation alcoolique (méthode analogue à celle utilisée par MORGAN & PARTRIDGE (197)).

L'opération peut être schématisée de la manière suivante :

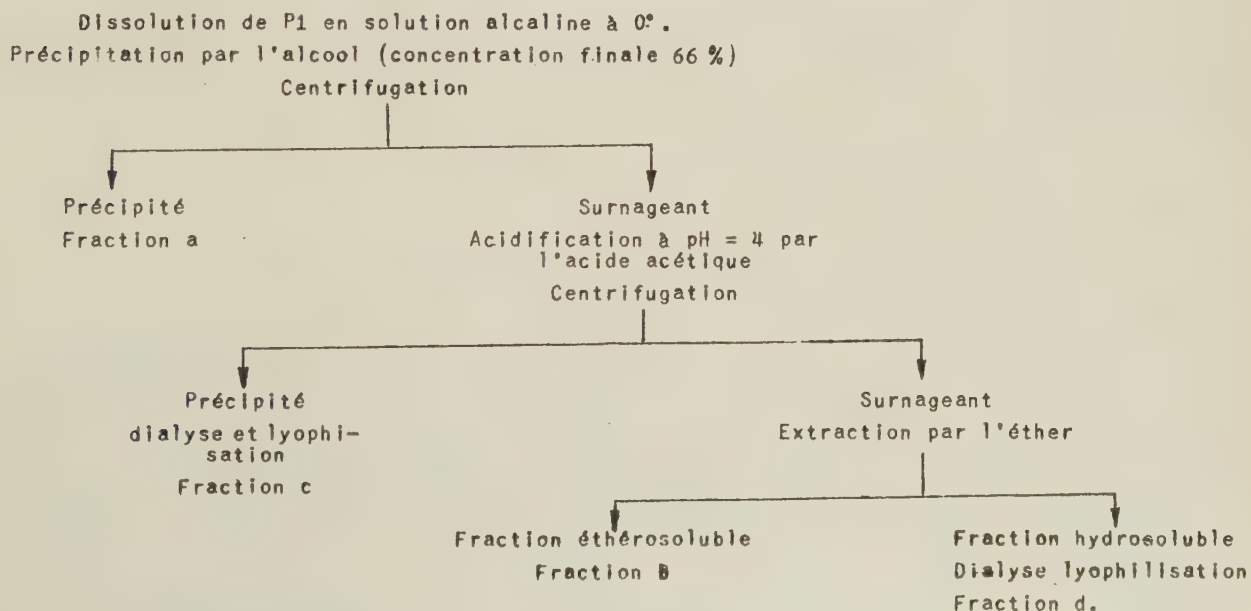


Tableau 6

PROPRIETES DES DIFFERENTES FRACTIONS
obtenues par DISSOCIATION ALCALINE
de la préparation toxique P₁

N° des fractions	Toxicité D M M en mg.	ACTIVITE		COMPOSITION CHIMIQUE			Solubilité dans l'eau	% du produit initial
		Hap-ténique	Anti-génique	N	P	Glucides		
a	0,1	+	+	3,86	0,63	7	soluble	50
b	non toxique	0	0	-	-	-	insoluble	1 à 5
c	>2,5	+	+	8,05	-	4,3	difficilement soluble	26
d	non toxique	0	0	-	-	-		

La composition chimique est indiquée en pourcentage du poids sec.
Les glucides sont exprimés en glucose.

Les propriétés de ces quatre fractions sont données dans le tableau 6. La toxicité passe dans la fraction **a**. Cette fraction est facilement soluble dans l'eau.

Etant donné la toxicité satisfaisante et la bonne solubilité de ce produit, nous nous sommes arrêtés à ce mode de dissociation et nous en avons déterminé les modalités optima. En voici la technique.

- PRECIPITATION PAR L'ALCOOL ALCALIN - PREPARATION a -

On met en suspension un gramme de P₁ dans 20 ml d'eau distillée. On ajoute à 0° la quantité de soude, en solution normale nécessaire pour obtenir un pH égal à 12 (il faut en moyenne 1,7 ml de soude normale pour 1 g de P₁). On ajoute 10g de chlorure de sodium et on complète le volume à 100 ml. On refroidit alors la solution à - 5°. Le produit P₁ est presque entièrement soluble à ce pH. On élimine le petit résidu insoluble par centrifugation à grande vitesse (10.000 t/m) pendant trente minutes à - 5°. On ajoute alors au surnageant, progressivement en refroidissant constamment deux volumes (200 ml) d'éthanol refroidi préalablement à - 15° - 20°. Un précipité abondant apparaît. On laisse en contact pendant trente minutes à - 8° - 10°, puis on recueille le précipité par centrifugation à -10°. Ce précipité est dissous dans l'eau distillée, où il est presque complètement soluble. On élimine le petit résidu insoluble par centrifugation à grande vitesse (10.000 t/m) pendant trente minutes. Après dialyse pendant 18 à 24 heures à 0°, la solution est lyophilisée. Le produit obtenu constitue ce que nous appelons la préparation "a".

Nous donnons dans le tableau 7 les toxicités de plusieurs préparations "a".

Tableau 7

TOXICITES DES PREPARATIONS SUCCESSIVES B - P₁ - a

N°	EXTRAIT BRUT		PREPARATION P ₁			PREPARATION a		
	D M M en mg.	D M M en mg. azote	D M M en mg.	D M M en mg. azote	D M 50 en mg.	D M M en mg.	D M M en mg. azote	D M 50 en mg.
4.193	-	-	0,55	0,058	-	-	-	-
5.137	-	-	0,80	0,081	-	0,35	0,026	-
8.000	-	-	0,80	0,081	-	0,35	0,030	-
8.032	1,98	0,150	0,50	0,045	0,25	0,25	0,018	0,16

Tableau 7 (suite)

TOXICITES DES PREPARATIONS SUCCESSIVES B - P₁ - a

N°	EXTRAIT BRUT		PREPARATION P ₁			PREPARATION a		
	D M M en mg.	D M M en mg. azote	D M M en mg.	D M M en mg. azote	D M 50 en mg	D M M en mg.	D M M en mg. azote	D M 50 en mg.
8.050	2,40	0,188	0,25	0,022	-	0,15	0,010	0,11
8.110	0,90	0,101	0,20	0,018	0,12	0,10	0,007	0,05
8.200	0,80	0,072	0,20	0,020	0,09	0,10	0,008	0,06

La précipitation de la toxine par l'alcool alcalin présente un excellent rendement puisqu'on retrouve le plus souvent dans la préparation "a", toute la toxicité initiale du P₁. Les calculs accusent même souvent des rendements supérieurs à 100 pour 100... probablement parce qu'une partie de la toxicité est masquée dans le P₁ du fait de son insolubilité dans l'eau distillée et physiologique qui oblige à inoculer des suspensions. WESTPHAL (295) a observé lui aussi que l'insolubilité d'un produit en diminue beaucoup la toxicité.

Si l'on considère les opérations successives (extraction - précipitation acétique - précipitation par l'alcool alcalin), on constate que le rendement final de la préparation toxique "a" est en moyenne de 1,5 à 2 pour 100 du poids de bactéries traitées et de 12 à 30 pour 100 de la toxicité initiale des germes (tableau 8).

Tableau 8

RENDEMENTS DE PREPARATION

N°	POIDS	RENDEMENTS PARTIELS DES OPERATIONS SUCCESSIVES				RENDEMENT FINAL %	
		Germes	B (1)	P ₁ (2)	a (3)	en poids	en toxicité
8.032	obtenus	100	9,24	2	1,48		
	% *		9,24	21,64	74,0	1,48	12
8.050	obtenus	112	7,50	3,10	2,22		
	% *		6,69	41,33	71,6	1,98	26
8.110	obtenus	108	6,45	2,73	1,78		
	% *		5,97	42,32	65,2	1,64	29
8.200	obtenus	271	20,10	5,82	4,18		
	% *		7,41	28,95	71,8	1,54	31

* Les rendements % de chaque opération sont rapportés à la précédente.

(1) rendement d'extraction=poids d'extrait brut par rapport au poids des germes.

(2) rendement de précipitation acétique=poids de préparation P₁ par rapport au poids d'extrait brut.

(3) rendement de précipitation alcoolique=poids de préparation "a" par rapport au poids de P₁.

La dissociation par l'alcool alcalin s'accompagne régulièrement d'une purification notable de la toxine. On observe (tableau 7) une diminution de la dose minima mortelle exprimée en poids sec par rapport à celle du P₁, et un abaissement encore plus marqué de la dose minima mortelle exprimée en milligrammes d'azote, ce qui implique une diminution de la quantité de protéines étrangères à la toxine.

Sous forme sèche, lyophilisée, la préparation "a" se conserve à basse température. Après un séjour de plusieurs mois à - 15°, elle reste parfaitement soluble dans l'eau et conserve sa toxicité.

- EXTRACTION DE LA TOXINE D'AUTRES GERMES

En vue des études immunologiques, nous avons préparé, à partir de la souche *S. typhi* 0901, l'antigène O toxique selon la méthode de Boivin à l'acide trichloracétique (suspension des germes dans une solution N/4 d'acide trichloracétique, contact de 12 à 24 heures à 0° - centrifugation - dialyse).

Nous avons également préparé avec cette même souche, des extraits par la solution hypertonique chlorure de sodium - citrate de sodium.

La toxicité des deux types de préparation est du même ordre, les doses minima mortelles variant de 0,10 à 0,30 mg pour les extraits bruts obtenus selon l'une et l'autre méthode.

Une souche rough immobile de *S. typhi*, la souche R 901, (variante rough de la souche 0 901) ne nous a donné comme il est de règle avec les souches rough, aucune toxine par la méthode à l'acide trichloracétique. Par contre, nous avons obtenu une préparation toxique (dose minima mortelle = 0,20 mg) au moyen de la solution hypertonique NaCl - Citrate.

Nous avons extrait par cette même méthode la toxine de différentes autres Salmonelles : *S. typhi* H 901 - *S. Manhattan* - *S. TY2 wβ* - *S. Paratyphi A* smooth et *S. paratyphi A* rough - *S. paratyphi B* smooth.

Nous avons également appliqué cette technique d'extraction à *Shigella Shigae* rough (souche Bucarest). Ce germe donne des préparations brutes beaucoup plus toxiques (20 à 25 fois) que celles obtenues avec les Salmonelles.

DEUXIEME PARTIE

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

CARACTERES GENERAUX

Les préparations toxiques obtenues, séchées par lyophilisation, se présentent sous forme d'une poudre blanche, amorphe, très légère.

Les préparations brutes sont très facilement solubles dans l'eau distillée. La solution à 1 pour 100 est nettement opalescente. Les produits T et P1 obtenus par précipitation acide ne sont plus solubles dans l'eau distillée. Si on dissout le précipité obtenu par les précipitations acides, aussitôt après l'avoir recueilli par centrifugation, en ajoutant de la soude progressivement, on obtient une bonne solution à pH = 7,2 - 7,5. Après lyophilisation, au contraire, le produit n'est plus soluble qu'à pH = 10 - 12. D'une façon comme de l'autre, la solution obtenue est fortement opalescente.

Après dissociation par l'alcool alcalin, on retrouve un produit (préparation "a") bien soluble dans l'eau (au moins jusqu'à 5 pour 100). La solution à 5 pour 100 est légèrement opalescente.

Les préparations toxiques sont insolubles dans l'alcool, l'acétone, l'éther. Elles sont solubles dans la pyridine à 90 pour 100.

La toxine est thermostable. L'étude de l'action de la chaleur sur la toxicité des préparations sera faite dans la troisième partie, au chapitre "toxicité".

COURBES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

Nous avons étudié pour un certain nombre de nos préparations l'absorption dans l'ultra-violet, avec l'appareil de Beckman. Nous donnons sur les figures 1, 2, 3, 4 quelques unes des courbes obtenues. En comparant les courbes correspondant à diverses préparations toxiques, nous constatons que la préparation "a" représente un produit relativement purifié par rapport aux précédents.

Ces préparations "a" présentent régulièrement une bande d'absorption entre 2.500 et 2.780 angströms, avec un sommet à 2.770 - 2.780 angströms.

COURBES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

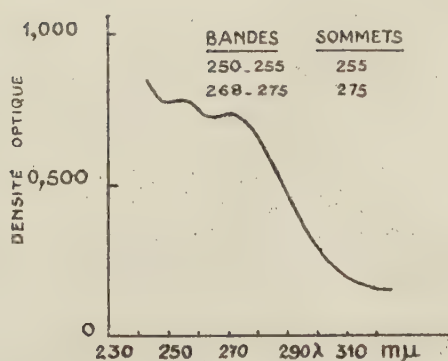


Figure 1. Préparation toxique P1 (N° 4.035)

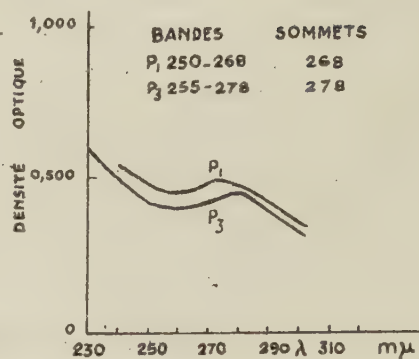


Figure 2. Préparations toxiques P1 et P3 (N° 4.123)

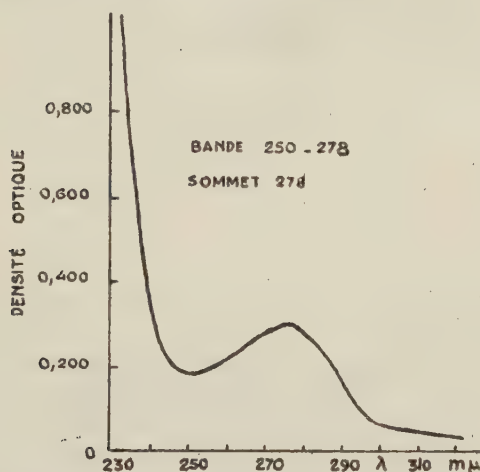


Figure 3. Préparation toxique a (N° 8.050)

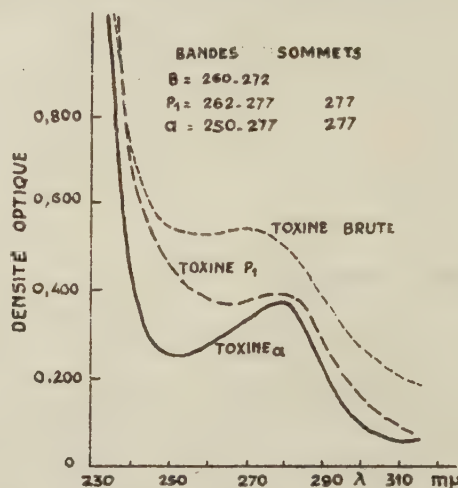


Figure 4. Préparations toxiques B, P1 et a (N° 8.200)

ETUDE ELECTROPHORETIQUE

Nous avons suivi la purification chimique de la toxine par étude électrophorétique. Les électrophorèses ont été faites dans l'appareil de Tiselius. Les préparations toxiques étudiées ont été mises en solution en tampon phosphate M/50 de pH = 7,6 - 7,7, additionné de 0,87 pour 100 de chlorure de sodium (force ionique $\mu = 0,2$). La concentration de la solution en substance toxique était de 0,5 ou 1 pour 100.

Les diagrammes correspondant à plusieurs de nos préparations sont reproduits (figures 5 à 10).

Les préparations toxiques "T", "P1", "P2" se montrent complexes à l'électrophorèse et renferment au moins trois ou quatre constituants. L'une de nos préparations P1 a montré un seul constituant principal, cependant le diagramme n'était pas symétrique. Il en est de même pour la préparation P4.

Par contre, les préparations toxiques "P3" (Fig. 8) et "a" (Fig. 10) paraissent bien homogènes.

L'homogénéité électrophorétique n'est pas un critère suffisant de pureté ; néanmoins, la comparaison de nos différentes préparations montre que nous avons réalisé une purification appréciable.

DIAGRAMMES ELECTROPHORESE



Figure 5. Préparation toxique P1
(N° 4.123) C = 0,5 %

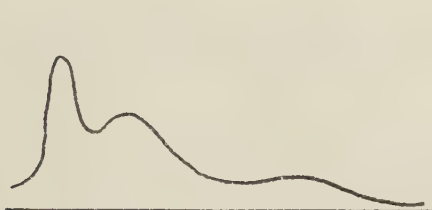


Figure 6. Préparation toxique P2
(N° 4.123) C = 0,5 %

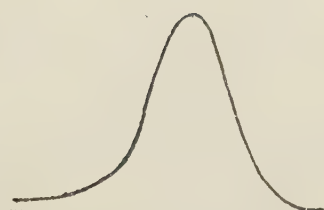


Figure 7. Préparation
toxique P1 (N° 4.035)
C = 0,5 %

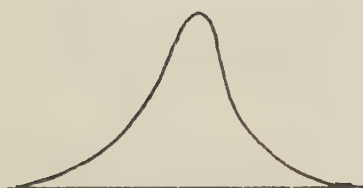


Figure 8. Préparation toxique
P3 (N° 4.123) C = 0,5 %

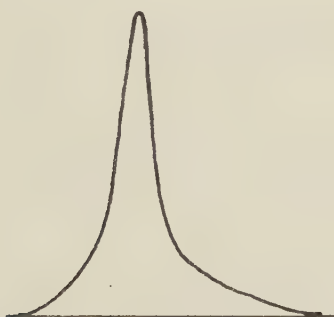


Figure 9. Préparation toxique
P4 (N° 4.193) C = 0,5 %

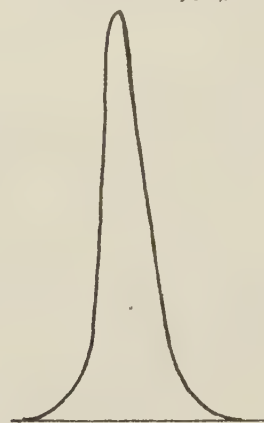


Figure 10. Préparation toxique
"a" (N° 8.200) C = 1 %

FIGURE	TAMPON PHOSPHATE	CHAMP	TEMPERATURE	TEMPS	CONSTITUANTS ELECTROPHORETIQUES	
					MOBILITES	PROPORTION %
5	pH = 7,7 μ = 0,2	5,06 volts/cm	3° C	4.000 secondes	$6,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	38,5
					3,2	38,5
					1,5	23,0
6	pH = 7,7 μ = 0,2	5,06 volts/cm	3° C	4.000 secondes	$5,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	22,1
					2,6	55,8
					1,3	22,1
7	pH = 7,7 μ = 0,2	4,5 volts/cm	3° C	13.560 secondes	$3,90 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	
8	pH = 7,7 μ = 0,2	5,06 volts/cm	3° C	6.000 secondes	$7,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	
9	pH = 7,7 μ = 0,2	4,92 volts/cm	3° C	9.500 secondes	$5,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	
10	pH = 7,7 μ = 0,2	2,7 volts/cm	3° C	15.600 secondes	$4,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	

COMPOSITION CHIMIQUE

Analyse qualitative

Nous constatons dans nos préparations toxiques la présence de groupes aminés (réaction à la ninhydrine positive), la présence de tyrosine (réactions de Millon, xanthoprotéique, α -nitroso β -naphthol positives), de tryptophane (réaction de Hopkins-Côle positive), d'arginine (réaction de Sakaguchi positive). La réaction du biuret positive montre l'existence de liaisons peptidiques. Les préparations de toxine R2 contiennent également des glucides (réaction de Molisch positive). La réaction de Biäl est positive, mais il n'est pas sûr que la coloration obtenue soit due à la présence de pentose ; LANDUCCI et coll. (164) ont noté que les réactions colorées utilisées pour la recherche des sucres peuvent être faussées par la présence de 5 hydroxyméthylfurfural dans certaines protéines. Nous avons effectué sur nos différentes préparations le dosage de Meijbaum (181), en refaisant chaque fois une courbe d'étalonnage avec du ribose. Les résultats, exprimés en ribose, donnent des chiffres moyens de 0,27 % pour l'extrait brut, 1,50 % pour les préparations T - P1 (obtenues par précipitation acide), 2,66 % pour les préparations P3 - P4 (obtenues par digestions protéolytique et phosphatase), 1,87 % pour les préparations "a" (obtenues par dissociation par l'alcool alcalin). Il n'est cependant pas certain qu'ils correspondent réellement à des pentoses, pour les raisons exposées plus haut.

Analyse quantitative

- TECHNIQUES -

L'azote a été titré par la méthode de Kjeldahl après quinze heures de minéralisation au moins, soit avec un catalyseur à base de sélénium, soit avec un catalyseur sulfate de potassium - oxyde de mercure. Le dosage est fait par distillation dans l'appareil de Markham ou dans l'appareil de Farnas-Wagner.

Le phosphore total a été dosé, après minéralisation avec un millilitre de solution 10 N d'acide sulfurique additionné de quelques gouttes d'acide nitrique concentré, selon la méthode de HORECKER (135), légèrement modifiée (concentration finale en acide sulfurique N au lieu de 2N). L'intensité de la coloration développée à chaud, a été mesurée au photomètre de Meunier (écran rouge). Nous refaisons chaque fois une courbe d'étalonnage avec une solution titrée de phosphate monopotassique.

Les sucres réducteurs ont été dosés, après hydrolyse à 100° par de l'acide sulfurique 2N. L'hydrolyse a été effectuée en tubes pyrex 240 x 18 mm munis d'un long tube faisant office de réfrigérant et s'adaptant par un bouchon rodé. Nous avons recherché la durée d'hydrolyse optimale ; des dosages ont été faits après des temps variables d'hydrolyse ; l'hydrolyse de huit heures a donné les résultats maximums. Après refroidissement l'hydrolysât est neutralisé par la soude et le volume est porté à une valeur exacte (10 ml en général) ; les sucres réducteurs sont dosés sur une partie aliquote par la méthode de HAGEDORN-JENSEN (127). Les résultats sont exprimés en glucose.

- RESULTATS -

- Extrait brut

Nous avons effectué les dosages d'azote sur nos préparations brutes de toxine. Les dosages ont été faits sur les préparations liquides dont nous avons d'autre part déterminé le poids sec par pesée après dessiccation à 110° jusqu'à poids constant d'un volume exact de solution. Les taux d'azote pour 100 sont excessivement variables selon les préparations. La moyenne est de 7,4 pour 100 du poids sec. Nous n'avons pas jugé utile de faire beaucoup d'autres dosages chimiques sur ces préparations brutes. A titre indicatif, signalons que le taux de phosphore déterminé sur un certain nombre de préparations oscille entre 0,15 et 0,50 pour 100, et les taux de sucres réducteurs dosés après hydrolyse et exprimés en glucose varient entre 3 et 10 pour 100.

- Préparations toxiques obtenues par précipitation acide

Un seul échantillon de préparation "T" (précipitation trichloracétique de l'extrait hypertonique) a été complètement analysé ; sa composition ne diffère pas notablement de celle des produits P1 (précipitation acétique de l'extrait dialysé). Les résultats des analyses (tableau 9) montrent que la composition chimique varie suivant les lots. Plusieurs caractères communs sont manifestes : présence d'azote, de phosphore, de polyoside. Les variations observées sont un indice de la non homogénéité des préparations, constatée déjà par l'étude électrophorétique. Le taux moyen d'azote (10,2 pour 100) est nettement plus élevé que dans les extraits bruts. Le taux moyen de sucres réducteurs après hydrolyse, exprimé en glucose, est voisin de 10 pour 100.

- Préparations toxiques obtenues par digestion protéolytique

Quelques échantillons des préparations toxiques "P3" et "P4" obtenues par digestion des produits "P1" et "P2" au moyen d'une préparation commerciale de trypsine et d'une préparation de phosphatase alcaline, ont été analysés (tableau 10). Comme on devait s'y attendre, ces préparations toxiques ont un taux d'azote beaucoup plus faible que les produits de départ, et on note une forte augmentation du taux de sucres réducteurs.

Tableau 9

COMPOSITION CHIMIQUE
Préparations toxiques T et P₁ obtenues par
Précipitation Acide

N°	Azote	Phosphore	Glucides	Cendres	Carbone	Hydrogène
T - 2.140	13	0,24	11	-	-	-
P ₁ 4.035	10,4	-	8,8	-	-	-
P ₁ 4.050	10,2	0,60	7,8	7,5	-	-
P ₁ 4.092	6,62	0,99	11,7	9,68	-	-
P ₁ 4.104	7,48	1,40	12,8	10,60	-	-
P ₁ 4.108	12,47	0,76	7,53	7,82	-	-
P ₁ 4.123	10,16	1,03	7,05	6,20	-	-
P ₁ 4.193	10,50	-	-	-	-	-
P ₁ 5.073	12,15	0,92	8,45	4,55	49,21	7,26
P ₁ 5.099	12,99	1,05	4,72	2,14	48,10	7,39
P ₁ 5.137	10,10	1,0	13,50	19,40	-	-
P ₁ 8.003	12,81	1,40	7,42	-	-	-
P ₁ 8.032	9,08	1,78	12,96	-	-	-
P ₁ 8.050	8,76	1,80	12,70	-	-	-
P ₁ 8.110	8,90	2,02	12,30	-	-	-
P ₁ 8.200	10,28	1,11	11,71	-	-	-

Tableau 10

COMPOSITION CHIMIQUE
Préparations Toxiques P₃ et P₄

N°	Azote	Phosphore	Glucides	Cendres	Carbone	Hydrogène
P ₃ 4.123	5,78	1,68	21,46	7,67	-	-
P ₃ 4.193	4,97	0,68	15,30	-	-	-
P ₃ 5.099	7,39	1,84	-	33,5	23,74	4,82
P ₄ 4.123	4,33	1,05	19,30	10,4	-	-
P ₄ 4.193	4,54	2,13	22,0	10,3	-	-
P ₄ 5.099	4,49	0,64	-	37,06	21,0	4,74

- Préparations précipitées par l'alcool en milieu alcalin

Nous donnons dans le tableau 11 les analyses de quelques préparations "a" (obtenues par dissociation alcaline et précipitation alcoolique). On constate que la composition chimique présente encore des variations suivant les lots de préparation. Le taux moyen d'azote est de 7,5 pour 100. Celui des sucres réducteurs est proche de 16,3 pour 100, un peu plus faible que celui des préparations "P3" et "P4", mais ces dernières étaient nettement moins toxiques.

Tableau 11
COMPOSITION CHIMIQUE
Préparations Toxiques "a"

N°	Azote	Phosphore	Glucides	Cendres	Carbone	Hydrogène
5.137	7,55	0,46	17,80	12,3	-	-
8.000	8,60	0,51	23,0	12,5	-	-
8.032	7,26	1,67	13,42	17,35	40,9	6,7
8.050	7,19	1,87	13,90	14,45	41,45	7,19
8.110	7,17	1,97	15,27	17,11	40,28	6,84
8.200	8,36	1,25	14,31	9,80	-	-

Si on compare les résultats des analyses chimiques de nos différentes préparations, on constate que les préparations "a", qui sont nettement plus toxiques que les préparations "P1" correspondantes, ont des taux d'azote plus faibles et des taux de sucres réducteurs plus forts que ces dernières. Les préparations "P3" et "P4" obtenues par digestions protéolytique et phosphatase, qui ont des taux d'azote encore plus faibles et des taux de sucres réducteurs encore plus forts que ceux des préparations "a" sont par contre nettement moins toxiques (doses minima mortelles en poids deux à dix fois plus élevées que celles de la préparation "a"). Si on exprime les doses minima mortelles en poids d'azote, celles-ci sont excessivement variables. Les meilleures préparations obtenues nous ont donné des doses minima mortelles de 7 à 8 microgrammes d'azote. On peut penser que toutes les préparations dont la dose minima mortelle exprimée en azote est supérieure à cette valeur sont soit en partie dénaturées, soit souillées de protéines étrangères, mais cela ne donne aucune indication sur la nature chimique réelle de l'élément toxique. Ces quelques microgrammes d'azote eux-mêmes font-ils partie intégrante de la molécule toxique, ou lui sont-ils surajoutés ?... Les résultats actuels de nos expériences ne permettent pas de le savoir.

L'observation des résultats des analyses chimiques des préparations "a", donnant en gros 50 pour 100 de protéine et 20 pour 100 de sucres (bien que ce chiffre ne donne pas la quantité réelle de polyside), laisse supposer qu'il existe un autre constituant. On peut penser qu'il s'agit, comme dans les préparations toxiques des autres auteurs (isolées des souches smooth) d'un lipide. La présence de phosphore pourrait correspondre, au moins en partie à l'existence d'un phospholipide. Nous avons recherché ce constituant par hydrolyse acide de la préparation "a".

FRACTIONNEMENT DE LA PRÉPARATION TOXIQUE "a" PAR HYDROLYSE ACIDE

Nous avons fractionné la préparation toxique "a" par hydrolyse acide ménagée, selon la technique utilisée par WESTPHAL (295). Après hydrolyse de trente minutes à 100° avec une solution normale d'acide chlorhydrique, on fait une extraction chloroformique et on étudie séparément la phase aqueuse et la phase chloroformique. Un précipité qui s'est formé au cours de l'hydrolyse se rassemble à l'interface entre le chloroforme et la phase aqueuse ; il est également recueilli et étudié.

- La fraction chloroformosoluble

représente 10 à 14 pour 100 de la préparation toxique "a". Elle a été obtenue par simple évaporation à sec et a l'aspect d'une masse pâteuse, de couleur jaunâtre. Nous avons effectué diverses analyses. Elle contient 0,85 pour 100 d'Azote et 0,7 pour 100 de Phosphore.

Une petite quantité d'une suspension aqueuse dense (0,075 ml = 0,5 mg) a été déposée sur papier et une électrophorèse à pH = 2,3 pendant quatre heures a montré :

- a) un constituant immobile, de nature lipidique,
- b) quatre constituants, ninhydrine positifs, qui se sont déplacés vers le pôle négatif,

Ce résultat montre que la fraction lipidique ainsi isolée n'est pas homogène et contient des amino-acides ou des peptides ninhydrine positifs.

Cette fraction chloroformosoluble contient des acides gras (qui n'ont pas été déterminés), une hexosamine, de l'éthanolamine et divers amino-acides (acide glutamique, acide aspartique, lysine, glycine, sérine, alanine, cystine). La recherche de la choline est restée négative. Ces résultats ont été obtenus de la manière suivante : le produit a été hydrolysé par HCl 5 N, pendant 15 heures à 100° ; après hydrolyse, des substances d'aspect lipidique apparaissent en surface ; elles sont dissoutes dans l'éther. La fraction hydrosoluble est évaporée à sec par distillation sous vide et on élimine complètement l'acide chlorhydrique. La substance sèche obtenue est étudiée par chromatographie sur papier, par chromatophorèse et par électrophorèse sur papier (BLASS (18)).

La présence de divers constituants révélés par l'étude électrophorétique sur papier à pH = 2,3 oblige à poser la question suivante : les divers constituants précédents sont-ils engagés dans une molécule complexe unique, ou certains d'entre eux sont-ils de simples impuretés libérées par l'hydrolyse courte par HCl, et dissoutes dans le chloroforme ? La purification ultérieure de ce produit nous donnera des indications à ce sujet.

- La fraction hydrosoluble.

séparée après l'extraction chloroformique contient du phosphore, des glucides et des protéines ou des peptides.

Une portion de cette fraction est utilisée pour l'étude du constituant protéidique. Dans ce but, elle est soumise à une hydrolyse acide forte (24 heures à 100° avec HCl 6 N). L'hydrolysate est étudié par chromatographie et électrophorèse sur papier et par chromatophorèse. On a identifié les acides aminés suivants : acide aspartique, acide glutamique, cystine, histidine, méthionine, lysine, arginine, proline, valine, leucines, phénylalanine, thréonine, tyrosine, hexosamine. On a également trouvé de l'éthanolamine ; une partie de la céphaline n'a donc pas passé en solution dans le chloroforme et se retrouve dans la fraction hydrosoluble.

Une autre portion de la fraction hydrosoluble a été réservée à l'étude des glucides. Elle est hydrolysée pendant quatre heures à 100° par une solution normale d'acide sulfurique. L'hydrolysate est neutralisé à pH = 4,5 par la baryte ; le sulfate de baryum est éliminé par centrifugation et le surnageant est concentré sous vide, pour obtenir une solution assez concentrée. L'étude de cette solution par électrophorèse sur papier (pH = 8,6) révèle la présence d'hexosamine, mais elle montre également des acides aminés, libérés par l'hydrolyse ; il est donc impossible de savoir si l'hexosamine décelée appartient au polyside, ou s'est trouvée détachée du constituant protéidique. La chromatographie sur papier a permis d'identifier le glucose et le galactose en quantités à peu près équivalentes. On a constaté l'absence de mannose, arabinose, rhamnose, xylose, ribose.

La recherche des sucres par chromatographie sur papier a été refaite sur la préparation toxique "a" totale, après hydrolyse par l'acide sulfurique normal. Les résultats ont été les mêmes : présence de glucose et galactose à l'exclusion d'autres sucres.

Ces résultats sont en accord avec ceux de WESTPHAL et LUDERITZ (295) qui ont trouvé seulement ces deux sucres dans le "lipopolysaccharide" des formes rough, tandis que celui des formes smooth contient en plus mannose et rhamnose.

- Le précipité

recueilli à l'interface solution chloroformique-phase aqueuse a été hydrolysé 24 heures à 100° par HCl 6 N en vue de l'identification des acides aminés. L'hydrolysate a été étudié par chromatographie et électrophorèse sur papier et par chromatophorèse. On retrouve les mêmes acides aminés que dans la fraction hydrosoluble, mais pas d'éthanolamine.

Le fractionnement réalisé par hydrolyse acide ménagée de la préparation "a" montre que celle-ci contient un élément protéidique (protéine ou peptide), un polyside et un lipide.

Quel est parmi ces constituants celui qui est responsable de la toxicité ?

Nous avons injecté à la souris par voie intra-péritonéale la fraction chloroformosoluble contenant le lipide, séchée par évaporation sous vide et remise en suspension très fine dans l'eau avec du tween. Nous n'avons trouvé aucune toxicité aux doses de 1 et 2 mg.

Il en a été de même pour la fraction hydrosoluble non dialysable (dialyse pour éliminer l'acide chlorhydrique), contenant peptides et glucides, séchée par lyophilisation et inoculée à la souris, en solution dans l'eau, aux doses de 2 et 4 mg.

Par contre, la fraction chloroformosoluble est douée d'un pouvoir pyrogène non négligeable. A la dose de 100 microgrammes par kilogramme, elle provoque une élévation de température de 1° à 1,5° (figure 14 page 32).

Ce fait nous paraît très important ; il est peut-être de nature à expliquer le désaccord apparent entre nos résultats et ceux de WESTPHAL. Celui-ci affirme que la toxicité est liée au constituant lipidique du complexe toxique, mais il semble avoir assimilé l'action toxique des endotoxines à leur pouvoir pyrogène. Il est indiscutable que les fractions toxiques que nous avons étudiées ont une action sur le centre régulateur de la température. A fortes doses, elles provoquent l'hypothermie, après une courte phase d'hyperthermie. A doses faibles (0,1 µg par kg),

elles n'ont plus qu'une action hyperthermisante, sans provoquer la mort de l'animal. (Cette étude sera exposée en détail au chapitre 1 de la troisième partie). La fraction chloroformosoluble a conservé cette action hyperthermisante, mais elle a perdu le pouvoir létal.

Si cette expérience de fractionnement par hydrolyse acide nous a donné quelques indications sur la structure chimique de la préparation toxique R2 "a", elle ne nous a pas donné de renseignement sur la nature chimique du constituant toxique. Nous avons alors cherché un autre mode de fractionnement susceptible de ne pas détruire la toxicité pour essayer d'isoler la co-pule toxique. Nous avons opéré par centrifugation.

FRACTIONNEMENT DE LA PREPARATION TOXIQUE "a" PAR ULTRA-CENTRIFUGATION.

Technique

Une certaine quantité (200 mg) de préparation "a" (N° 8110) a été mise en solution dans 20 ml d'eau distillée (solution à 1 %). La solution obtenue a été centrifugée pendant 30 minutes à 12.000 t/m dans une centrifugeuse refroidie à 0° (centrifugeuse Servall). Il se sépare un culot infime "F1", qui est recueilli et repris par 10 ml d'eau distillée, où il paraît soluble.

Le surnageant subit ensuite une centrifugation de 2 heures à 17.000 t/m, ce qui correspond à environ 25.000 g (centrifugeuse Spinco refroidie à 0°). Le culot "F2" est soigneusement recueilli et dissous dans 10 ml d'eau distillée.

Le surnageant est centrifugé pendant 3 heures à 40.000 t/m, ce qui correspond à environ 100.000 g (centrifugeuse Spinco), toujours à une température voisine de 0°. Il se sépare un culot abondant "F3" qui est redissous, comme F1 et F2, dans 10 ml d'eau distillée. Nous appelons F4 la fraction non sédimentée (surnageant) par cette troisième centrifugation.

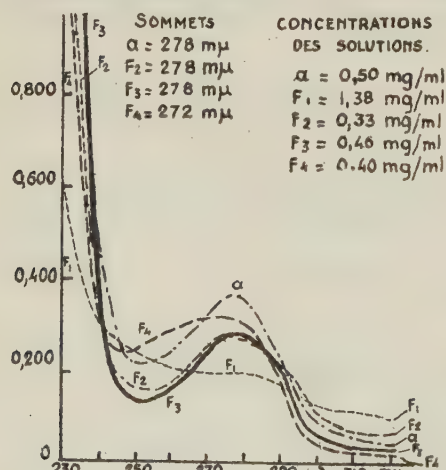
Résultats

Les quatre fractions ainsi obtenues ont été étudiées au point de vue toxicité, pouvoir absorbant dans l'ultra-violet, composition chimique et précipitation spécifique en gel. Le détail de cette dernière étude sera donné dans la troisième partie. Ces différentes déterminations, sauf le dosage des glucides, ont été faites sur les solutions dont le poids sec a été déterminé par pesée après dessiccation à poids constant à l'étuve à 110° d'un volume exactement mesuré. Par suite d'une perte de solution F1, le poids sec n'a pu en être déterminé et le poids de cette fraction a été calculé par différence.

Les courbes d'absorption dans l'ultra-violet sont données sur la figure 11. On ne remarque pas de différence essentielle entre ces courbes, sauf pour celle de la fraction F1.

Le tableau 12 donne les résultats des dosages chimiques et de toxicité. On constate que la plus grande partie du produit en poids et en toxicité se retrouve dans la fraction F3 et qu'il en reste aussi une fraction importante dans la fraction F4. Néanmoins, cette dernière est nettement moins toxique que F3. Il semblerait que la fraction F2 soit la plus toxique, cependant l'imprécision des déterminations ne permet pas de l'affirmer. La fraction F1 ne sépare que des impuretés et n'entraîne pratiquement pas de toxine.

Fig. 11. FRACTIONNEMENT PAR ULTRA-CENTRIFUGATION (Préparation toxique "a" N° 8.110)
COURBES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET



SOMMETS
DES SOLUTIONS.
α = 278 mμ
F2 = 278 mμ
F3 = 278 mμ
F4 = 272 mμ

CONCENTRATIONS
DES SOLUTIONS.
α = 0,50 mg/ml
F1 = 1,38 mg/ml
F2 = 0,33 mg/ml
F3 = 0,46 mg/ml
F4 = 0,40 mg/ml

F1 = fraction sédimentée à 10.000 g
F2 = fraction sédimentée à 25.000 g
F3 = fraction sédimentée à 100.000 g
F4 = fraction non sédimentée à 100.000 g
a = préparation toxique initiale

Tableau 12

FRACTIONNEMENT PAR ULTRA-CENTRIFUGATION de la préparation a (n° 8.110)

Frac-tions	% du produit initial	TOXICITE		ANALYSES CHIMIQUES		
		D.M.M. en % g	D.M. 50 en % g	Azote	Phos-phore	glu-cides.
tox. a		100	55	7,17	1,97	15,27
F 1	6,9	-	> 280	2,18	-	-
F 2	6,7	-	26	8,19	3,83	-
F 3	46,2	< 92	-	7,12	2,68	19,04
F 4	40,2	160	30	7,52	1,79	15,25

Les chiffres donnés pour la D.M.M. et la D.M. 50 n'ont qu'une valeur indicative en raison du petit nombre d'animaux qui a pu être fait.

Les chiffres indiqués, pour la composition chimique, représentent le pourcentage du poids sec.

Les glucides sont exprimés en glucose.

Les analyses chimiques faites montrent que les trois fractions restent complexes et contiennent peptides et glucides ; Les taux d'azote sont assez comparables. Le taux de glucides de F4 est un peu plus faible que celui de F3, mais l'écart est peu important ; les taux de phosphore seuls diffèrent davantage. Le lipide n'a pas été étudié en raison des faibles quantités de ces fractions.

Comme on le voit, cette opération n'a permis aucun fractionnement net. Le fait qu'on trouve de la toxine dans les trois fractions F2, F3, F4 peut s'interpréter de deux manières : ou le constituant portant la toxicité est polymérisé et se trouve sous forme de molécules plus ou moins grosses, ou bien la toxicité est fixée à une copule très petite qui fait partie de molécules de tailles différentes.

Notons que BOIVIN (44) avait déjà constaté après ultra-centrifugation de son antigène O, que celui-ci se retrouvait à la fois dans la fraction sédimentée et dans le surnageant. D'autre part, IKAWA et NIEMAN (140) étudiant de la même façon le complexe qu'ils ont isolé du colibacille ont également trouvé des activités semblables aux différentes fractions séparées.

Telle que, cette expérience ne peut fournir aucune indication sur la nature chimique réelle du constituant toxique.

TROISIEME PARTIE

PROPRIETES BIOLOGIQUES ET IMMUNOLOGIQUES

CHAPITRE I

TOXICITE

- DOSE MINIMA MORTELLE

Nous avons dosé la toxicité de nos préparations par inoculation intrapéritonéale à la souris blanche de 20 grammes avec un délai d'observation de quatre jours. On inocule toujours au moins quatre à six animaux par dose. La dose minima mortelle est la plus petite dose tuant tous les animaux. Elle est variable selon les préparations. La plus faible dose obtenue a été de 0,10 milligramme. La dose minima mortelle recherchée par inoculation intraveineuse à la souris est du même ordre de grandeur, parfois un peu plus faible. Par voie sous-cutanée, il faut généralement des doses plus fortes ; les résultats sont surtout moins réguliers.

Il est à noter que la quantité absolue de substance toxique inoculée n'entre pas seule en jeu dans la toxicité, mais que la concentration de la solution aqueuse de toxine joue un rôle important. Une dose sûrement mortelle à une certaine concentration ne l'est plus que de façon irrégulière si on l'inocule sous un plus grand volume.

La dose cinquante pour cent de mortalité (L.D. 50) a été déterminée pour un certain nombre de nos préparations par la méthode des "probits" (53 - 170 à 172) et par celle de REED & MUENCH (236). Les résultats obtenus par ces deux méthodes concordent le plus souvent.

Nous avons cherché à déterminer la toxicité pour d'autres animaux. Chez le rat blanc, la dose minima mortelle est égale à deux ou trois fois celle de la souris. Chez le lapin, elle est très variable selon les animaux ; en général, des doses de 20 à 50 microgrammes par kilogramme, inoculées par voie intraveineuse, tuent le lapin en moins de 24 heures. Comme on le voit par ces doses, le lapin est beaucoup plus sensible que la souris à la toxine. Ce fait a été signalé par de nombreux auteurs avec l'endotoxine O.

- DOSE MINIMA REACTIVE

Comme l'antigène O de Boivin (DELAUNAY & LASFARGUES 77 - 168) la toxine R2 présente des propriétés nécrosantes que nous avons étudiées par injection intradermique au lapin blanc, préalablement rasé à la tondeuse. La dose minima réactive que l'on peut ainsi définir est de l'ordre de 8 à 20 microgrammes. Mais elle varie beaucoup d'un animal à l'autre, si bien que nous n'avons pas pu l'utiliser comme méthode de titrage.

- ETUDE DES EFFETS TOXIQUES SUR L'ANIMAL

Sur souris

Nous avons pu reproduire expérimentalement chez la souris, par injection de toxine R2, tous les symptômes de la salmonellose des souris, provoquée par *Salmonella enteritidis* Danysz, germe naturellement très pathogène pour la souris. Une seule injection de notre toxine ne permet généralement pas d'observer ces symptômes, car les animaux meurent rapidement, sans présenter de symptômes caractéristiques ou guérissent après une intoxication très temporaire. Par contre, en faisant des injections répétées, par voie sous-cutanée, de doses infra mortelles (environ 1/10

de la dose minima mortelle pendant cinq jours de suite), nous avons pu observer tous les symptômes typiques de la Salmonellose des souris : oedème du museau, conjonctivite purulente, diarrhée, amaigrissement rapide. La mortalité survient dans des délais semblables à ceux de l'infection par *Sal. Danysz*. (6 à 15 jours après inoculation dans le cas de l'infection - 4 à 10 jours après notre cinquième inoculation de dose faible dans notre expérience).

En outre, nous avons observé que ces inoculations répétées étaient, en définitive, plus sévères qu'une même dose inoculée en une seule fois. Avec une dose totale un peu inférieure à la dose mortelle cinquante, tous les animaux (20 souris) ont subi une profonde intoxication et la mortalité a été de 70 pour 100. Cette forte toxicité des doses répétées a été observée à maintes reprises et a rendu très difficiles les expériences d'immunisation.

Sur cobayes

Nous inspirant des travaux de Reilly, nous avons expérimenté sur des cobayes l'injection de la toxine R2 dans les ganglions mésentériques. On procède par laparotomie, en opérant stérilement. Deux heures après l'intervention, les animaux sont aplatis sur le sol de la cage et présentent un aspect hébété, tandis que des animaux témoins opérés dans les mêmes conditions, et inoculés avec de l'eau physiologique restent vifs et semblent en bon état. Avec une dose de toxine égale à deux fois la dose minima mortelle pour la souris, les animaux meurent en 12 heures.

A l'autopsie, on constate toujours hypertrophie et hémorragie du ganglion inoculé et des ganglions supérieurs. Si on inocule dans le ganglion inférieur, les deux autres ganglions sont hémorragiques ; si, au contraire, on inocule dans le ganglion moyen, il est hémorragique ainsi que le ganglion supérieur, tandis que le ganglion inférieur reste normal. Nous avons observé également de façon constante, des lésions hémorragiques des capsules surrénales et une congestion des poumons. Notons aussi de manière fréquente, mais moins régulière, une congestion hémorragique du gros intestin, de l'estomac, du péritoine avec ou sans épanchement de liquide péritonéal hémorragique.

Par injection intraveineuse, on observe exactement les mêmes lésions, mais la mortalité avec la même dose de toxine paraît moins régulière et la dose minima mortelle est difficile à préciser, d'autant plus qu'on observe assez souvent des morts tardives (trois semaines) dont on ne peut guère tenir compte pour l'établissement d'une dose mortelle.

Sur lapins

a) - Symptômes généraux

Le temps d'incubation après injection de la toxine par voie intraveineuse est très court : un quart d'heure après l'inoculation, l'animal commence à être malade et le tableau complet de l'intoxication s'établit en une à trois heures. Pour les doses fortes, l'animal peut

Figure 12. LAPINS INTOXIQUEES PAR LA TOXINE R2

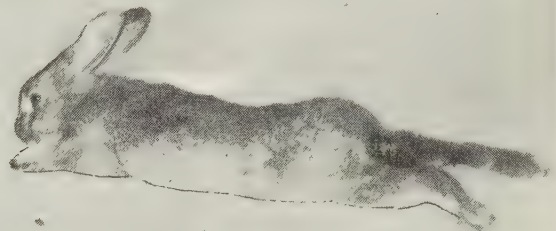
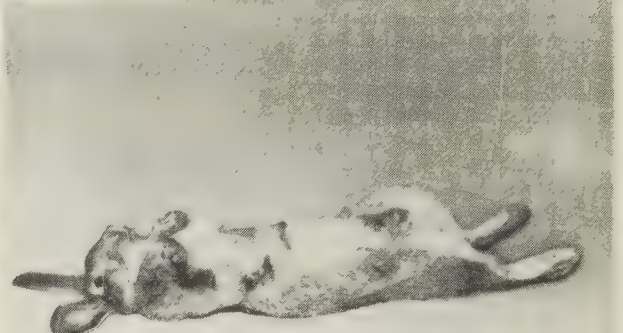
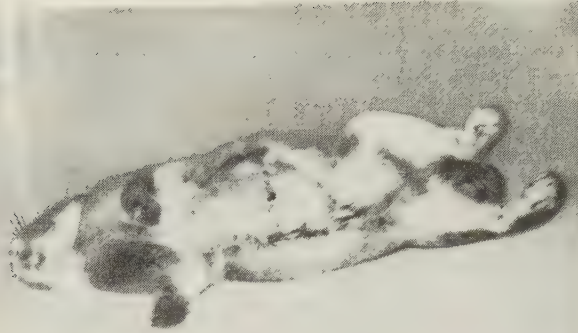


Figure 12. LAPINS INTOXIQUÉS PAR LA TOXINE R2.



mourir en deux à trois heures, parfois même moins. Il présente d'abord une dyspnée violente suivie d'un état de prostration accompagné d'une certaine catatonie : l'animal est effondré ; si on le met sur le dos ou sur le côté (figure 12), il y restera parfois un long moment, sans réaction, les yeux clos ; si on le secoue à ce stade, il ouvre les yeux et se redresse et ne présente aucune paralysie apparente. On observe fréquemment, mais pas de façon régulière, une diarrhée transitoire entre la première et la troisième heure après l'injection, diarrhée qui est toujours beaucoup moins abondante que celle provoquée par l'inoculation de l'antigène O, préparé selon la technique de Boivin.

Pour les doses faibles, infra mortelles, l'animal présente une dyspnée plus discrète et un état de somnolence et de torpeur qui dure plusieurs heures, puis régresse.

b) - Symptômes particuliers

- Action sur la température de l'animal.

La température de l'animal (température rectale) est prise avant inoculation de la toxine, puis à intervalles de temps réguliers, toutes les demi-heures, puis toutes les heures. Pour les doses fortes, elle a été notée tous les quarts d'heure au début.

La toxine provoque chez le lapin une hyperthermie transitoire dont la durée est en général d'autant plus brève que la dose est plus forte, suivie d'une hypothermie augmentant rapidement jusqu'à la mort. L'hypothermie peut dépasser quatre degrés. Elle est habituellement moins marquée, un à deux degrés, pour les doses plus faibles (20 à 100 microgrammes par kg), mais les doses provoquant ces réactions varient beaucoup avec les animaux (figure 13).

Les doses très faibles inférieures à 1 microgramme par kg provoquent une hyperthermie nettement plus forte, deux degrés. Mais même à ces doses très faibles, les animaux témoignent d'une intoxication.

Figure 13 Température des lapins intoxiqués par la toxine R2

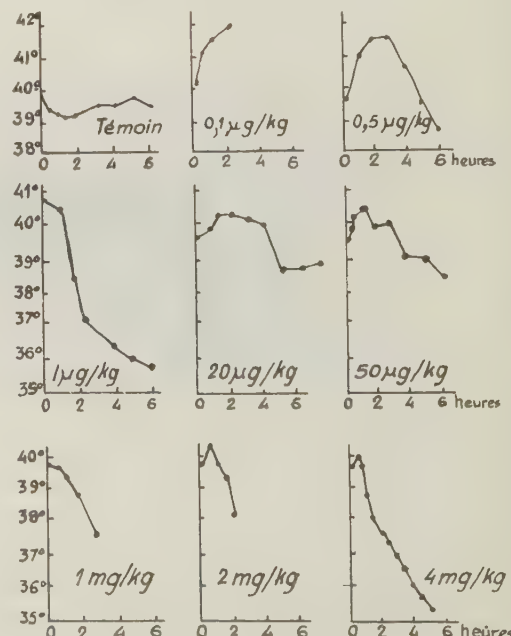
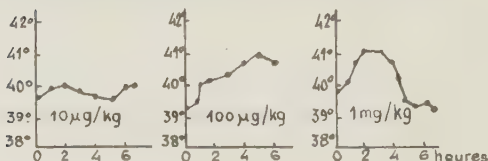


Figure 14 Pouvoir pyrogène de la fraction lipidique de la préparation toxique a



- Action sur la glycémie

Technique

Nous avons dû opérer les prélèvements sanguins par ponction au coeur. La toxine provoque en effet une constriction des vaisseaux périphériques (19 à 22) qui rend impossibles les saignées à l'oreille : la veine marginale complètement sectionnée au bistouri ne saigne pratiquement pas.

Les dosages du glucose par la méthode de Hagedorn-Jensen, ont été effectués le jour même sur des prises de 0,1 ml qui, mesurées à la pipette de précision donnent des résultats satisfaisants ; la défécation était faite immédiatement après la prise de sang.

Figure 15 Glycémie des lapins intoxiqués par la toxine R2

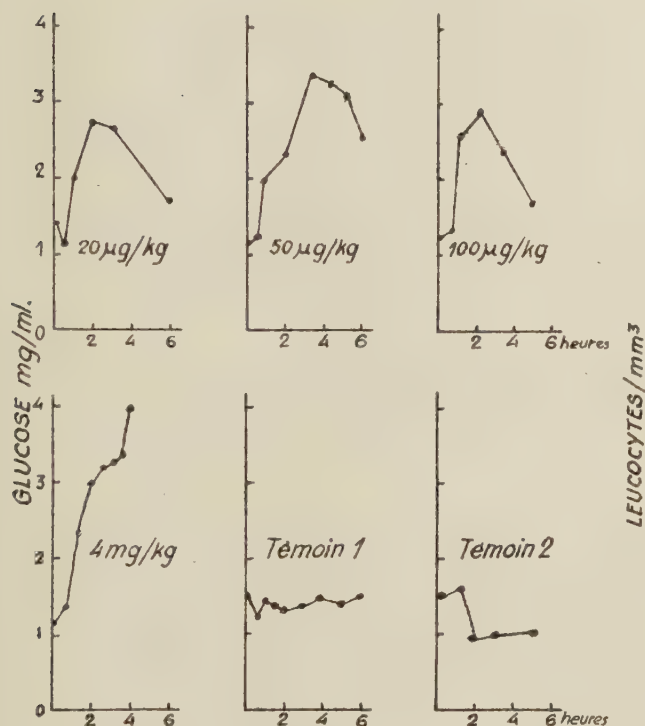


Figure 16 Numération des leucocytes des lapins intoxiqués par la toxine R2

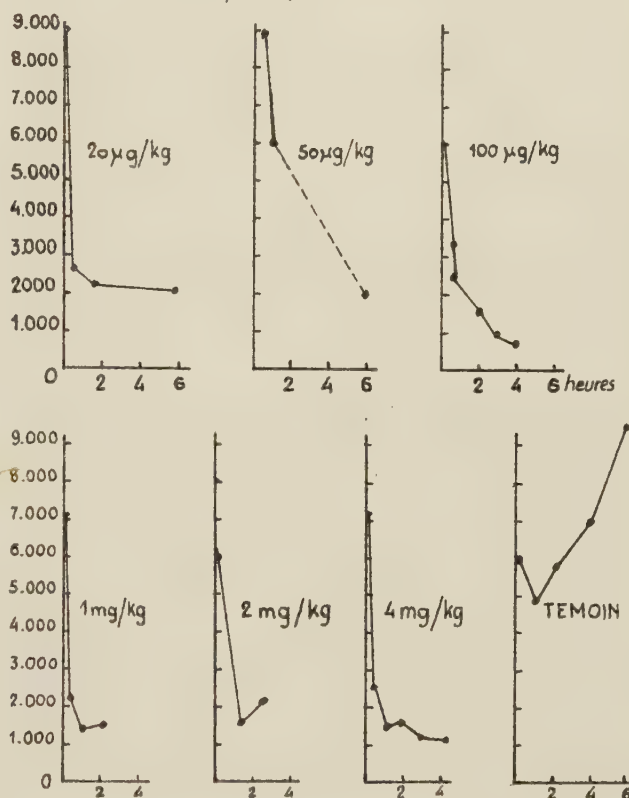


Figure 17 Formules leucocytaires des lapins intoxiqués par la toxine R2

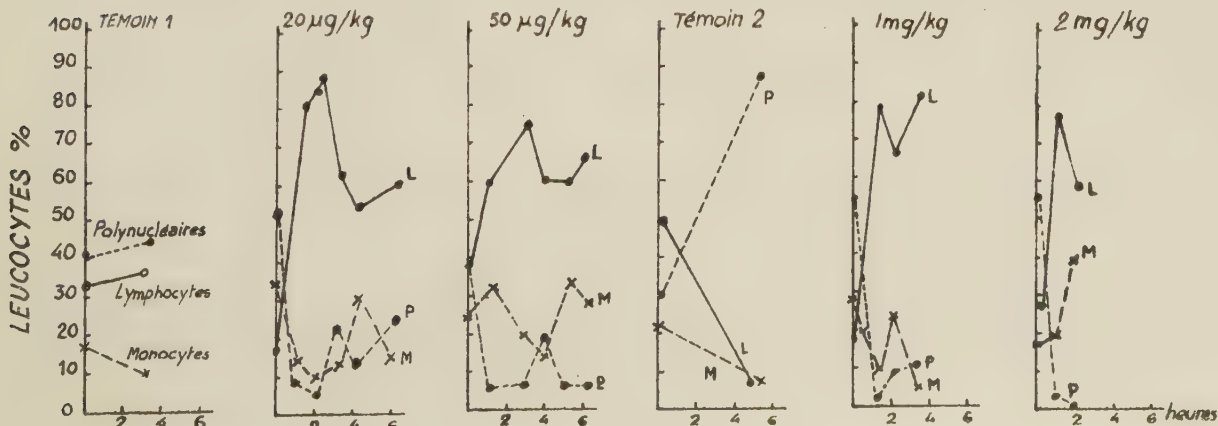


TABLEAU 13

ETUDE DE LA TOXICITE SUR LE LAPIN
Injection I.V. de 20 μ g. de préparation "a" par kg.
(préparation "a" 8.200)

Temps en heures	Température	Glycémie mg. par ml	NUMERATIONS		FORMULE LEUCOCYTAIRE				
			Hématies (millions)	Leucocytes	Polynucléaires			Monocytes	Lymphocytes
					N	B	E		
0	39,6	1,44	5,1	9.000	49	2	1	31	17
1/2	39,8	1,22	5,3	2.700	7	0	0	12	81
1	40,1	2,02	5,0	-	0	0	0	3	97
2	40,1	2,66	5,4	2.300	3	0	0	9	88
3	40,0	2,60	5,5	2.500	24	0	0	13	63
4	39,8	2,39	4,3	-	15	0	0	30	55
5	38,6	-	-	-	-	-	-	-	-
6	38,6	1,82	4,7	2.300	26	0	0	14	60
7	38,6	-	-	-	-	-	-	-	-

Résultats.

Nous donnons à titre d'exemple les chiffres obtenus pour une de nos expériences (tableau 13).

La toxine R2 provoque une forte augmentation de la glycémie. Le taux est maximum entre la deuxième et la quatrième heure puis il redescend progressivement vers la normale (figure 15).

Nous avons contrôlé sur des animaux témoins que les ponctions cardiaques répétées n'amènent pas d'augmentation de la glycémie : les faibles variations observées sont toujours au contraire dans le sens d'une diminution. Les animaux témoins ont supporté jusqu'à neuf ponctions en six heures, sans présenter de trouble ni pendant l'expérience, ni dans les jours suivants.

Nos résultats sont en accord avec les données classiques. L'action hyperglycémiant de la toxine typhoïdique a en effet été notée par de nombreux auteurs : MENTEN (182), MENTEN & KING (183), DELAFIELD (74 - 75), BOIVIN (27), BOCQUET & IZARD (23).

- Action sur la formule sanguine.

Les numérations globulaires révèlent une forte leucopénie. Celle-ci est accusée dès la première heure après l'injection. Le nombre des globules blancs passe de 6 à 10.000 par millimètre cube avant injection à des chiffres variant de 900 à 3.000 après (figure 16).

Cette leucopénie s'accompagne d'une lymphocytose relative : on constate une diminution considérable, parfois même une disparition presque totale des polynucléaires du sang circulant (figure 17).

Les animaux témoins observés parallèlement présentent au contraire une leucocytose plus ou moins marquée. D'autre part, ou la formule leucocytaire n'est pratiquement pas modifiée, ou bien il y a au contraire polynucléose.

Nous avons aussi compté les hématies : leur nombre demeure à peu près constant : les écarts observés sont de l'ordre des erreurs de numération.

La leucopénie accompagnée de lymphocytose avait déjà été observée, soit avec l'antigène O, soit avec les filtrats de culture du bacille d'Eberth. Citons entre autres : DELAUNAY (76) MUTERMILCH (200), ROBERTSON & YU (243), H.R. MORGAN '88 et 188).

- THERMOSTABILITE DE LA TOXINE R2

Un chauffage de deux heures à 60° ou de trente minutes à 70° n'altère pas la toxicité des préparations. Par contre, le chauffage à 100° provoque une baisse notable de la toxicité. Après trente minutes à 100°, à pH voisin de la neutralité, la baisse est faible ; après deux heures trente, la baisse est notable sans qu'il y ait jamais une disparition complète de la toxicité ; la dose minima mortelle devient trois à six fois plus élevée.

- ESSAI DE DETOXIFICATION DE LA TOXINE R2

Nous avons tenté un grand nombre de fois d'obtenir un dérivé atoxique de notre toxine R2, en vue de l'utiliser comme antigène vaccinant. Les différents procédés essayés ne nous ont donné que des produits très partiellement détoxifiés.

Formol

Le séjour à l'étuve à 37° pendant un mois en présence de Formol, qui permet d'obtenir les anatoxines classiques, dérivées des toxines des germes gram positifs (diphtérie, tétanos, etc...) ne nous a pas donné de résultat valable. On observe bien une détoxification partielle du produit, mais celle-ci est due au séjour à l'étuve et ne semble guère influencée par le formol ; la solution témoin conservée à la même température a subi la même perte de toxicité. Si on opère à 26°, la perte de toxicité est faible, même après cinquante jours. Si on opère à l'étuve à 50°, elle est au contraire plus forte. Nous avons essayé d'augmenter la proportion de formol et de la porter de 5 à 10 pour 1.000, et de prolonger jusqu'à trois mois le séjour à l'étuve à 37°, la détoxification reste toujours partielle : trois à 10 fois moins toxique.

Cependant, en maintenant la solution de toxine formolée à pH = 8,4 à l'étuve à 37° pendant un mois (technique utilisée par DUBOS (83) pour la toxine SHIGA), nous avons pu obtenir une détoxification plus forte, mais non totale. Une dose égale à dix doses mortelles de toxine initiale ne tue plus les souris. De plus le produit obtenu conserve ses propriétés vaccinales.

Iode

Nous inspirant de la méthode de préparation des vaccins bactériens antityphoïdiques préconisée par RANQUE et SENEZ (229 et 256) qui les déclarent moins toxiques que les vaccins chauffés, nous avons essayé l'action de l'iode. Les expériences diverses faites soit à la glacière 0° + 4°, soit à l'étuve à 37° ne nous ont donné aucun résultat.

Acétylation

TREFFERS (269) indique qu'il a obtenu une détoxification des endotoxines de *Shigella dysenteriae* et d'*Escherichia typhosa* par acétylation (produit 60 fois moins toxique).

Nous avons fait plusieurs expériences dans ce sens. Le traitement de la toxine R2 (préparation "T") par le cétène n'a amené qu'une faible perte de toxicité : produit obtenu environ trois fois moins toxique que le produit initial.

Les expériences d'acétylation par l'anhydride acétique de la toxine R2 (préparations "P4" et "a") en solution dans la pyridine ne nous ont également donné qu'une détoxification partielle : produit trois à six fois moins toxique, avec une perte importante de matériel (perte de 40 à 50 %). En outre, le produit partiellement détoxifié obtenu semble avoir perdu son pouvoir vaccinant. L'immunisation d'un lot de dix souris avec la préparation "a" ainsi traitée, faite dans les mêmes conditions qu'avec la préparation "a" initiale (les détails seront donnés plus loin) a été mieux supportée par les animaux (moins de mortalité en cours) mais ne leur a conféré aucune immunité anti-toxique.

CHAPITRE II

POUVOIR ANTIGENIQUE

Les préparations de toxine R₂ sont antigéniques chez le lapin et le cheval. Les injections répétées de doses faibles et croissantes provoquent la formation d'anticorps agglutinants, précipitants et fixant le complément. Nous avons étudié ces propriétés tout au long de nos travaux et nous avons dans ce but préparé un certain nombre de sérums de lapins et de chevaux.

— PREPARATION DES SERUMS

Nous avons préparé des sérums de lapins avec chacun des produits toxiques successivement obtenus au cours de nos recherches. A titre de comparaison, nous avons préparé aussi des sérums avec l'antigène O extrait selon la méthode de Boivin, et avec la fraction non polysidique obtenue par dégradation de celui-ci par l'acide acétique à chaud. Nous avons en outre immunisé des lapins avec les corps bactériens d'une série de Salmonelles de constitutions antigéniques différentes. Les sérums ont été recueillis stérilement. Pour chaque sérum de lapin préparé, nous avons mélangé le sérum de plusieurs animaux. Les sérums ont été conservés en ampoules scellées, à la glacière à 0° +4°.

Les tableaux 14, 15 et 16 donnent la liste de ces différents sérums.

Tableau 14
SERUMS DE LAPINS
SERUMS ANTITOXIQUES

N°	Antigènes utilisés pour la préparation
4	Préparation R ₂ T (précipitation trichloracétique)
6	Antigène O extrait selon technique de Boivin
7	Extrait R ₂ brut
15	Préparation R ₂ - P ₃ (digestion protéolytique de P ₁)
16	Préparation R ₂ - P ₄ (digestion protéolytique de P ₂)
21	Préparation R ₂ - P ₁ (précipitation acétique)
22	Préparation R ₂ - P ₂ (précipitation alcoolique du surnageant de P ₁)
25	Préparation R ₂ - a (précipitation par alcool alcalin - Lot n° 8.003)
26	Préparation R ₂ - a (précipitation par alcool alcalin - Lot n° 8.050)
28	Fraction P.C. obtenue par dégradation de l'antigène O Boivin (1)

(1) Cette fraction a été obtenue de la façon suivante : l'antigène O préparé par extraction trichloracétique à partir de la souche 0901 est soumis à l'hydrolyse à 100° pendant 1 heure en milieu acétique N/10.

Il se forme un précipité qui est recueilli = fraction P.C.

Tableau 15
SERUMS DE LAPINS - SERUMS ANTI-BACTERIENS

N° Des sérums	Bactéries utilisées pour la préparation	Antigènes
2	S. typhi rough R ₂ formolées	H (d) - R
3	S. typhi rough R ₂ chauffées	R
5	S. typhi 0901 chauffées	O (IX)
8	S. Manhattan formolées (souche rough)	H (d) - R
9	S. Gaminara formolées	H (d) O (XVI)
10	S. paratyphi A rough	H (a) R
11	S. typhi TY ₂	H (d) O (IX) - Vi
12	S. typhi H 901 formolées	H (d) O (IX)
13	S. paratyphi B smooth traitées par l'Acétone	H (b) O (IV-V)
14	S. paratyphi B rough traitées par l'Acétone	H (b) R
27	S. Rauss 965	Vi

Tableau 16
SERUMS DE CHEVAUX

SERUMS ANTIBACTERIENS

N°	Bactéries utilisées pour la préparation
787	S. typhi rough R ₂ formolées
862	S. typhi rough R ₂ chauffées

SERUMS ANTITOXIQUES

N°	Antigènes utilisés pour la préparation
704	Extrait R ₂ brut
92	Préparation R ₂ - T
107	Préparation R ₂ - T
659	Fraction P.C. obtenue par dégradation de l'antigène O Boivin
24	Anatoxine Shiga

Protocoles d'immunisation

- 1) - Sérums antibactériens

Les bactéries utilisées pour la préparation des sérums ont toujours été cultivées en bouillon pour éviter la formation possible d'anticorps anti-gélose. Les germes récoltés par centrifugation étaient lavés à l'eau physiologique, puis tués soit par addition de formol à 2 pour

1.000 lorsqu'on voulait conserver les antigènes flagellaires, soit par chauffage à 100° pendant deux heures trente, lorsqu'on voulait les éliminer pour ne conserver que les antigènes somatiques. Pour l'antigène Vi (souches Ty2 et Rauss 965), les germes ont été fraîchement préparés avant chaque injection et inoculés vivants. Les suspensions de germes étaient standardisées au photomètre.

- a) Sérums de lapins

Pour les sérums de lapin anti-bactéries R₂ formolées (N° 2), O 901 (N° 5), Ty2 (N° 11), H 901 (N° 12), Rauss 965 (N° 27), nous avons pratiqué trois injections intraveineuses par semaine pendant trois semaines :

1ère semaine : 1 Milliard de germes par injection.

2ème semaine : 2 - - -

3ème semaine : 5 - - -

le tout sous un volume de 1 ml, et une injection de rappel de 6 Milliards de germes après un repos de huit jours, soit au total 30 milliards de germes. Les animaux ont été saignés à blanc cinq à huit jours après la dernière injection.

Pour les autres sérums le taux d'agglutination obtenu étant faible, l'immunisation a dû être prolongée. Nous avons continué à faire trois injections de 5 Milliards de germes chacune par semaine.

- Sérum anti bactéries R2 chauffées (N° 3)

24 injections en huit semaines, soit une dose totale de 100 milliards de germes environ.

- Sérum anti S. *Manhattan* (souche rough) (N° 8)

28 injections en 10 semaines, soit environ 110 milliards de germes au total.

- Sérum anti S. *Gaminara* (N° 9)

15 injections en 5 semaines, soit environ 50 milliards de germes au total.

- Sérum anti S. *Paratyphi A* rough (souche A 104) (N° 10)

23 injections en huit semaines, soit environ 100 milliards de germes au total.

La nécessité de prolonger l'immunisation avec les souches rough montre déjà, conformément aux données classiques, que les antigènes rough présents dans les souches utilisées sont de mauvais antigènes.

- Les sérums anti S. *Paratyphi B* smooth (N° 13) et anti S. *paratyphi B* rough (N° 14) ont été préparés rapidement : 3 injections seulement à 3 jours d'intervalle.

- b) sérums de chevaux

- Cheval anti bactéries R2 formolées (N° 787)

Nous avons utilisé des suspensions très denses, standardisées au photomètre, de manière à contenir environ 50 milliards de germes par ml. Les injections ont été faites par voie sous-cutanée presque uniquement, (quelques injections par voie intraveineuse ayant provoqué un choc), à raison de deux par semaine.

Durée totale d'immunisation : 7 mois, coupée de temps de repos : on a pratiqué des saignées d'essai tous les mois et chaque saignée est suivie d'un repos d'une dizaine de jours pendant lequel on interrompt les injections.

Doses inoculées : doses croissantes de 0,5 à 40 ml, c'est-à-dire de 25 à 2.000 milliards de germes.

Nombre total d'injections : 42

Quantité totale inoculée : environ 35.000 milliards de germes.

- Cheval anti bactéries R2 chauffées (N° 862)

Nous avons utilisé les mêmes densités de suspensions et le même protocole que pour le sérum précédent, mais l'animal est mort avant la fin de l'immunisation.

Durée totale de l'immunisation : 5 mois.

Nombre total d'injections : 30

Quantité totale inoculée : environ 15.000 milliards de germes.

L'immunisation des chevaux a été suivie par réactions d'agglutinations. La montée progressive du taux des agglutinines est indiquée au tableau 18.

- 2) - Sérums antitoxiques

- a) Sérums de lapins

Les sérums préparés avec nos antigènes toxiques ont demandé en général une longue immunisation. Etant donné la toxicité relativement élevée de ces substances pour le lapin, il faut utiliser un assez grand nombre d'animaux (10 à 20 lapins par antigène pour avoir trois à six survivants). Les injections répétées de doses faibles de toxine provoquent en effet un état d'amaigrissement et de cachexie progressive et beaucoup d'animaux meurent en cours d'immunisation. Il arrive aussi que des animaux fassent un choc après une injection et meurent dans les deux heures suivantes. Cependant les animaux survivants (20 à 40 % en moyenne) présentent une résistance indiscutable vis-à-vis de 10 à 20 doses minima mortelles de toxine.

Tableau 17
SÉRUMS DE LAPINS ANTITOXIQUES
PROTOCOLES D'IMMUNISATION

Nature de l'antigène	N° des sérums	Nomb. des injections	Voie	Dose initiale en mg	Dose finale en mg	Quantité inoculée en mg	Durée
R ₂ - B	7	20	I.V.-I.M.	0,1	2,5	15	4 mois
R ₂ - T	4	22	I.V.-I.M.	0,02	2	15	4 mois
R ₂ - P ₁	21	5	I.V.	0,1	1	3	2 semaines
R ₂ - P ₂	22	7	I.V.	1	10	35	2 semaines
R ₂ - P ₃	15	13	I.V.	0,0135	1,35	9	6 semaines
R ₂ - P ₄	16	9	I.V.	0,38	3,8	24	1 mois
R ₂ - a	25	14	I.V.	0,10	3	18	2 mois
R ₂ - a	26	16	I.V.-I.M.	0,01	2	9	2 mois
O.B. (1)	6	26	I.V.-I.M.	0,02	1	10	4 mois
P.C. (2)	28	14	I.V.-I.M.	0,1	2	10	2 mois $\frac{1}{2}$

(1) antigène O extrait selon la technique de Boivin.

(2) fraction P.C. obtenue par dégradation de l'antigène O Boivin.

- Protocole d'immunisation :

D'une manière générale, les lapins ont reçu 2 ou 3 injections par semaine, soit toutes intraveineuses, soit plus souvent alternativement intraveineuses et intramusculaires. Nous donnons au tableau 17 les protocoles correspondant à chaque antigène. Les variations dans le mode d'immunisation nous ont été imposées par la toxicité propre de chacun des produits étudiés. Nous avons été obligés de tenir compte de l'état des animaux et de la façon dont les injections étaient supportées, pour déterminer les augmentations progressives des doses. Nous avons dû dans certains cas, devant l'état cachectique des animaux, ou en raison de chocs provoqués par les inoculations, couper l'immunisation par des temps de repos, ou bien interrompre et saigner les animaux après un nombre restreint d'injections.

- b) Sérums de chevaux

- Sérum anti toxine R2 (N° 704) préparé avec l'extrait brut (R2B)

Les injections ont été faites sous la peau, avec adjonction d'alun de potassium à la concentration de 6 pour 1.000. L'animal était inoculé régulièrement deux fois par semaine, sauf deux périodes de repos de 10 jours. Une injection faite par voie intraveineuse après 2 mois d'immunisation a provoqué un choc important.

L'immunisation a été interrompue après 4 mois $\frac{1}{2}$ par la mort de l'animal en l'espace de une heure et demi, par choc brutal, consécutif à une injection sous-cutanée de 400 mg de produit. Une saignée de huit litres faite 15 jours avant nous a procuré un stock de sérum qui nous a permis de l'étudier.

Tableau 18

**IMMUNISATION DES CHEVAUX ANTIBACTERIENS
MONTEE DU TAUX DES AGGLUTININES**

CHEVAL 787 ANTI R₂ FORMOLE

DUREE D'IMMUNISATION						
Germes agglutinés	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	7 mois
O 901	100	100	100	100	100	100
H 901	5.000	20.000	20.000	50.000	50.000	50.000
R ₂ formolés	5.000	20.000	20.000	20.000	50.000	50.000
R ₂ chauffés	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

CHEVAL 862 ANTI R₂ CHAUFFE

DUREE D'IMMUNISATION					
Germes agglutinés	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois
O 901	100	100	100	100	100
H 901	100	1.000	1.000	5.000	5.000
R ₂ formolés	1.000	1.000	1.000	5.000	5.000
R ₂ chauffés	100	1.000	1.000	5.000	5.000

Tableau 19

**IMMUNISATION DES CHEVAUX ANTITOXINE R₂
MONTEE DU TAUX DES AGGLUTININES**

DUREE D'IMMUNISATION						
cheval 704	Germes agglutinés	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	
	R ₂ formolés	5.000	-	10.000	30.000	

suite page suivante

Durée de l'immunisation jusqu'à la saignée : 4 mois

Nombre d'injections : 26

Quantité totale inoculée : 3,5g - dose initiale : 2mg - dose finale : 200 mg

L'immunisation a été suivie par la montée du taux des agglutines (tableau 19) et par la recherche des anticorps protecteurs anti toxine R₂. Ceux-ci n'apparaissent nettement

qu'à partir du troisième mois d'immunisation. L'étude en sera faite plus loin.

- Sérums anti toxine R₂ préparés avec la préparation toxique T (R₂ - T)

 Injections par voie sous-cutanée avec adjonction d'alun de potassium, même concentration que ci-dessus.

 Dose initiale : 0,7 mg

 Dose finale : 150 mg

- Cheval 107 : durée d'immunisation : 7 mois avec 33 injections

- Cheval 92 : - - - 8 - - 37 -

Tableau 19 (suite)

IMMUNISATION DES CHEVAUX ANTITOXINE R₂
MONTEE DU TAUX DES AGGLUTININES

	Germes agglutinés	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	7 mois
cheval 107	O 901	10	10	10	10	100
	H 901	1.000	10.000	100.000	200.000	200.000
	R ₂ formolés	1.000	10.000	50.000	200.000	200.000
	R ₂ chauffés	100	100	100	1.000	1.000

	Germes agglutinés	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	8 mois
cheval 92	O 901	10	10	10	10	100
	H 901	1.000	5.000	100.000	200.000	200.000
	R ₂ formolés	1.000	5.000	10.000	200.000	200.000
	R ₂ chauffés	100	100	100	1.000	1.000

- Sérum anti antigène P.C. (N° 659)

Un cheval a été immunisé avec la fraction P.C. obtenue par hydrolyse acétique (1 heure à 100° en milieu acétique N/10) de l'antigène O de Boivin et ne contenant pas de polyside spécifique. Notre objectif était de chercher s'il était possible d'obtenir un sérum antitoxique indépendant des antigènes spécifiques.

Durée d'immunisation : un an, coupé par des périodes de repos, imposées par le fait qu'il nous a été impossible de produire assez vite les quantités d'antigène nécessaire.

Nombre d'injections : 50

Le sérum obtenu agglutine les bactéries, à bas titre et de façon non spécifique (tableau 20), mais il ne possède aucun pouvoir protecteur antitoxique.

Les différents sérums ainsi préparés ont été étudiés :

1 *in vitro* par les réactions d'agglutination, de fixation du complément, de précipitation.

2 *in vivo* par la recherche du pouvoir protecteur et neutralisant (pour quelques sérums seulement).

- REACTIONS D'AGGLUTINATION

- 1 - Technique

A) Préparation des antigènes

Les suspensions bactériennes ont été préparées selon les recommandations de KAUFFMANN (154)

Bactéries O : chauffées en eau distillée pendant 2 h 1/2 à 100°, puis remises en suspension en eau physiologique (NaCl 8,5 pour 1.000).

Bactéries H : suspension obtenue par addition de formol (2p.1000) à une culture de 8 heures en bouillon.

Bactéries Vi : suspension de germes fraîchement préparés, utilisés vivants ou formolés à 2 p. 1.000 au moment de l'emploi.

Bactéries rough : nous avons utilisé soit des suspensions en milieu pauvre en NaCl (solution à 2 p. 1.000) où elles sont stables, formolées à 2 p. 1.000, soit des suspensions préparées selon la technique de BEGUIN (12 - 13), bactéries préalablement traitées par l'acétone et séchées, remises en suspension en solution NaCl 8,5 pour 1.000 au moment de l'emploi.

Bactéries R₂ : eau distillée à 100° pendant 2 h. 1/2, puis remises en suspension en solution NaCl à 2 p. 1.000.

Toutes nos suspensions ont été standardisées par lecture au photomètre de manière à contenir 500 millions de germes par ml. (55 divisions au photomètre de Klett-écran vert N° 54).

B) Réaction

Les dilutions du sérum ont été faites soit en solution NaCl à 2 p. 1.000 pour les bactéries rough (non traitées par l'acétone) soit en solution physiologique NaCl 8,5 p. 1.000 pour tous les autres germes.

Les réactions ont été faites selon le protocole suivant :

Répartition par tube : dilution de sérum 0,5 ml
suspension microbienne standardisée 0,5 ml

Nous avons toujours pratiqué deux lectures. :

1ère lecture après : 4 h à 45° pour les agglutinations H
 20 h à 45° - O et R
 3 h à 37° - VI

2ème lecture de contrôle après une nuit en glacière 0° + 4°

- 2 - Résultats

Les résultats des agglutinations sont donnés, dans les tableaux 20 et 21 sous la forme de l'inverse de la dilution limite du sérum donnant une agglutination visible. L'examen de ces tableaux permet de tirer les conclusions suivantes :

Le sérum anti bactéries R₂ chauffées contient uniquement des anticorps anti-antigène rough. Ces anticorps se retrouvent dans tous les sérums, mais en plus grande quantité dans les sérums préparés avec d'autres souches rough (*S. Manhattan*, *S. paratyphi A* rough, *S. paratyphi B* rough). Ceci est en accord avec les données classiques : il existe un antigène commun à toutes les Salmonelles en forme rough ("cosmopolitisme" des formes rough de SCHUTZE (253)) et cet antigène rough est présent aussi chez les formes smooth, bien que masqué par l'antigène O (GRINNEL (125), BOIVIN (45), HENDERSON (133), BEGUIN (12 - 13), KRÖGER (157 à 159)).

Les préparations de toxine R₂ : B, P₁, P₂ et "a" contiennent l'antigène flagellaire H (d) et l'antigène rough.

Les préparations P₃ et P₄ ne contiennent plus d'antigène flagellaire, mais seulement l'antigène rough. La persistance de la toxicité dans ces préparations après élimination de l'antigène flagellaire permet d'affirmer que la toxine n'a pas de relation avec cet antigène. Elle est au contraire associée à la présence de l'antigène rough.

Les bactéries O 901 sont légèrement agglutinées par certains de nos sérums antitoxiques, de même que les sérums anti bactéries O 901 et anti antigène O Boivin agglutinent légèrement les bactéries R₂. On doit penser que ces agglutinations sont dues à la présence de l'antigène rough dans les bactéries smooth.

On observe que l'antigène H (d) est un bon antigène ; il provoque la formation de grandes quantités d'anticorps agglutinants. L'antigène R au contraire, est un mauvais antigène : les quantités d'anticorps agglutinants formés sont beaucoup plus faibles, même après une immunisation très prolongée.

Tableau 20

AGGLUTINATIONS - SERUMS ANTI BACTERIENS -

SERUMS		SUSPENSIONS DE GERMES											SERUMS			
Anti	N°	R2 For- molé	R2 Chauffé	O 901	H 901	S. Man- hat.	S. Gamin	Ty 2	Rausse 965	Para A rough Formolé	R2	Para A rough traités par l'acétone	Shiga rough	Shiga smooth	N°	Anti
R2 formolé	2	10.000	1.000	10	10.000	-	-	20.000	-	-	200	200	0	0	2	R2 formolé
R2 chauffé	3	1.000	1.000	10	10	10	10	10	10	-	40	20	0	0	3	R2 chauffé
O 901	5	100	100	1.000	100	10	0	100	10	-	0	0	0	0	5	O 901
H 901	12	10.000	100	1.000	10.000	-	-	10.000	-	-	20	20	0	0	12	H 901
S. Manhattan	8	20.000	1.000	10	20.000	10.000	20.000	-	1.000	-	40	100	0	0	8	S. Manhattan
S. Gaminara	9	1.000	100	10	1.000	1.000	5.000	-	100	-	-	-	-	-	9	S. Gaminara
Ty 2	11	10.000	100	5.000	10.000	-	-	50.000	100	-	0	0	0	0	11	Ty 2
Rausse 965	27	500	100	100	500	50	50	1.000	5.000	-	-	-	-	-	27	Rausse 965
Para A rough	10	100	100	10	10	10	10	-	-	10.000	200	100	40	0	10	Para A rough
Para B smooth	13	40	40	-	-	40	-	-	-	-	0	0	0	0	13	Para B smooth
Para B rough	14	200	400	0	-	20	-	0	-	-	100	200	0	0	14	Para B rough
R2 formolé (cheval)	787	50.000	1.000	100	50.000	50.000	50.000	-	-	-	-	-	-	-	787	R2 formolé (cheval)
R2 chauffé (cheval)	862	5.000	5.000	100	5.000	1.000	5.000	-	-	-	-	-	-	-	862	R2 chauffé (cheval)

L'indication 0 représente une réaction négative pour la dilution au 1/10.

Tableau 21

AGGLUTINATIONS SERUMS ANTITOXIQUES

SERUMS		SUSPENSIONS DE GERMES										SERUMS					
Anti	N°	R ₂ formolé	R ₂ Chauf- fé	o 901	H 901	S. Manhat.	S. Gami	Ty 2	Raus- 965	Para A rough for- molé	R ₂	Para A rough	Para B rough	Shiga rough	Shiga smooth	N°	Anti
traités par l'acétone																	
R ₂ -B	7	10.000	1.000	10	10.000	10.000	5.000	5.000	100	-	800	200	20	0	0	7	R ₂ -B
R ₂ -T	4	20.000	1.000	0	20.000	20.000	-	-	-	-	400	200	40	0	0	4	R ₂ -T
R ₂ -P ₁	21	-	0	0	3.200	3.200	-	200	-	-	40	100	40	0	0	21	R ₂ -P ₁
R ₂ -P ₂	22	-	0	0	3.200	3.200	-	0	-	-	20	0	0	0	0	22	R ₂ -P ₂
R ₂ -P ₃	15	400	800	100	20	40	-	-	-	-	100	100	40	0	0	15	R ₂ -P ₃
R ₂ -P ₄	16	200	200	100	100	40	-	-	-	-	100	100	40	0	0	16	R ₂ -P ₄
R ₂ -a	25	-	2.000	100	5.000	2.000	-	10.000	-	-	800	800	400	400	400	25	R ₂ -a
R ₂ -a	26	5.000	1.000	0	5.000	10.000	-	10.000	-	-	1.000	1.000	500	200	200	26	R ₂ -a
R ₂ -B	704	30.000	200	10	50.000	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	704	R ₂ -B
R ₂ -T	92	200.000	1.000	100	200.000	50.000	50.000	-	1.000	-	-	-	-	-	-	92	R ₂ -T
R ₂ -T	107	200.000	1.000	100	200.000	100.000	200.000	-	1.000	-	-	-	-	-	-	107	R ₂ -T
Antigène O.B.	6	100	100	2.000	100	-	-	Chauffé 500	-	-	0	0	0	0	0	6	Antigène O.B.
Fraction P.C.	28	10	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	Fraction P.C.
Fraction P.C.	659	500	500	200	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	659	Fraction P.C.

- REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

- 1 - Technique

Les réactions de fixation du complément ont été faites en prenant les précautions de standardisation recommandées par KABAT & MAYER (149).

Les globules rouges de mouton utilisés sont conservés en solution d'Alsever. La suspension d'hématies est standardisée au photomètre de façon à contenir 1 million de globules rouges par millimètre cube. Les globules rouges sont sensibilisés par 4 unités hémolytiques.

Le complément est une préparation commerciale lyophilisée de l'Institut Pasteur. Le titrage est effectué avant chaque expérience sur un lot d'ampoules. On emploie pour la réaction 2 unités H 100 sous le volume de 0,2 ml.

Les antigènes ont été préparés de la façon suivante :

Antigènes bactériens : suspension standard étalon, ou suspension mère = suspension de densité optique = 0,150 correspondant à 75 unités du photomètre de Klett (écran N° 54).

Antigènes solubles : solution mère = solution à 5 mg par ml.

Protocole de la réaction

Sérum dilué	0,2 ml
Antigène dilué	0,2 ml
Complément (2 unités H 100)	0,2 ml
Globules rouges sensibilisés	0,2 ml

Détermination de la force des antigènes

Nous avons dans un premier temps déterminé la force des antigènes vis-à-vis des différents sérums. Celle-ci est exprimée sous la forme de l'inverse de la dilution limite de l'antigène qui introduit sous le volume de 0,2 ml dans le système (volume total 0,8 ml) fixe la totalité du complément (2 unités) en présence de 0,2 ml de **sérum dilué au 1/50**.

Nous appelons **unité d'antigène** la plus faible quantité d'antigène (0,2 ml de la dilution limite) qui fixe la totalité du complément dans le système indiqué, en présence de 0,2 ml du **sérum homologue dilué au 1/50**.

Détermination de la force des sérums

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la **force des sérums** vis-à-vis de chaque antigène. Pour cela, une quantité fixe de chaque antigène égale à **une unité** (déterminée vis-à-vis de son sérum homologue) est mise en présence de quantités variables des différents sérums (0,2 ml de dilution variable de sérum). La force de chaque sérum vis-à-vis d'un antigène donné est exprimée sous la forme de l'inverse de la dilution limite du sérum, qui en présence d'une unité de l'antigène considéré permet la fixation totale du complément (2 unités).

- 2 - Résultats

Les résultats donnant la force des antigènes sont indiqués aux tableaux 22 et 23 pour les antigènes bactériens, aux tableaux 24 et 25 pour les antigènes solubles. Ils représentent les réactions entre une quantité fixe de sérum et des doses variables d'antigène. Ils permettent de comparer entre eux les différents antigènes par rapport à un même sérum.

Les résultats donnant la force des sérums sont portés sur les tableaux 26 et 27, pour les sérums antibactériens, sur les tableaux 28 et 29 pour les sérums antitoxiques. Ils représentent les réactions entre une quantité fixe d'antigène et des doses variables de sérum. Ils permettent de juger dans une certaine mesure de la richesse des sérums en anticorps vis-à-vis d'un antigène déterminé. En se reportant à la méthode de préparation de ces sérums, on peut ainsi avoir une indication sur le pouvoir antigène de ces substances.

L'observation de ces différents tableaux permet de tirer les conclusions suivantes :

- 1 - Les sérums antibactériens préparés avec des bactéries en forme rough réagissent toujours avec un ou plusieurs de nos antigènes solubles R2. Ils ne réagissent jamais avec l'antigène O Boivin.

- 2 - Les sérums antibactériens préparés avec les bactéries en forme smooth ne réagissent avec aucun de nos antigènes solubles R2, sauf le sérum antibactérien O 901 qui réagit avec la seule préparation P3.

- 3 - Les sérums obtenus avec les différentes préparations toxiques R2 (Sauf le sérum anti P2) réagissent avec presque toutes les suspensions de bactéries rough. Ils ne réagissent jamais avec les suspensions de bactéries O 901, sauf le sérum anti P3 et seulement avec la suspension mère non diluée de ces bactéries.

Tableau 22

REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Force des Antigènes Bactériens

SERUMS ANTI BACTERIENS

SERUMS		ANTIGENES = BACTERIES					
Anti	N°	R ₂ Formolées	R ₂ Chauffées	o 901	Manhattan	Para A rough	Para B rough
Normal	1	0	0	0	0	0	0
R2 formolé	2	<u>4</u>	4	0	8	8	4
R2 chauffé	3	4	<u>16</u>	0	8	2	0
O 901	5	16	0	<u>2</u>	0	0	0
H 901	12	2	0	0	4	0	0
Manhattan	8	2	4	0	<u>16</u>	0	16
Ty 2	11	0	0	1	4	0	0
Para A rough	10	4	4	0	32	<u>2</u>	8
Para B rough	14	8	8	0	16	8	<u>16</u>
Para B smooth	13	4	0	0	8	0	0

Dilution limite d'antigène fixant le complément en présence de 0,2 ml de sérum dilué en 1/50.
 Le chiffre 0 indique une réaction négative avec la suspension d'antigène pur.
 Les chiffres soulignés représentent les unités d'antigène.

Tableau 23

REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Force des Antigènes Bactériens

SERUMS ANTITOXIQUES

SERUMS		ANTIGENES = BACTERIES					
Anti	N°	R ₂ Formolées	R ₂ Chauffées	o 901	S. Manhattan	Para A rough	Para B rough
R ₂ -B	7	16	4	0	16	16	16
R ₂ -T	4	16	4	0	8	16	8
R ₂ -P ₁	21	16	8	0	16	0	2
R ₂ -P ₂	22	0	0	0	0	0	0
R ₂ -P ₃	15	64	8	1	16	8	8

Tableau 23 (suite)
REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT
Force des Antigènes bactériens
SERUMS ANTITOXIQUES

SERUMS		ANTIGENES = BACTERIES					
Anti	N°	R ₂ Formolées	R ₂ Chauffées	O 901	S. Manhattan	Para A rough	Para B rough
R ₂ -P ₄	16	4	8	0	8	8	16
Antigène O. B.	6	4	0	2	0	0	0

Dilution limite d'antigène fixant le complément en présence de 0,2 ml de sérum dilué au 1/50.
Le chiffre 0 indique une réaction négative avec la suspension d'antigène pur.

Tableau 24
REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT
Force des antigènes solubles
SERUMS ANTIBACTERIENS

SERUMS		ANTIGENES SOLUBLES					
Anti	N°	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	a	O B
Normal	1	0	0	0	0	0	0
R2 formolé	2	20	0	160	2	50	0
R2 chauffé	3	0	0	20	0	25	0
O 901	5	0	0	250	0	-	4
H 901	12	0	0	0	0	-	0
S. Manhattan	8	40	0	160	0	-	0
Ty 2	11	0	0	0	0	-	8
Para A rough	10	20	0	160	0	640	0
Para B rough	14	20	0	160	0	640	0
Para B smooth	13	0	0	0	0	-	0

Dilution limite d'antigène soluble fixant le complément en présence de 0,2 ml. de sérum dilué au 1/50.

Le chiffre 0 indique une réaction négative avec la solution pure d'antigène.

Tableau 25

REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Force des Antigènes Solubles

SERUMS ANTITOXIQUES

SERUMS		ANTIGENES SOLUBLES					
Anti	N°	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	a	O B
R ₂ -B	7	160	0	160	2	640	0
R ₂ -T	4	160	80	160	2	100	0
R ₂ -P ₁	21	<u>160</u>	80	160	0	50	0
R ₂ -P ₂	22	160	<u>80</u>	0	0	-	0
R ₂ -P ₃	15	20	0	<u>160</u>	2	100	0
R ₂ -P ₄	16	20	0	160	<u>2</u>	-	0
Antigène O. B.	6	0	0	0	2	-	<u>4</u>

Dilution limite d'antigène soluble fixant le complément en présence de 0,2 ml. de Sérum dilué au 1/50.

Le chiffre 0 indique une réaction négative avec la solution pure d'antigène.

Les chiffres soulignés représentent les unités d'antigène.

Tableau 26

REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Force des sérums antibactériens

DILUTION LIMITE DU SERUM AVEC UNE UNITE D'ANTIGENE BACTERIEN

SERUMS		ANTIGENES BACTERIENS					
Anti	N°	R ₂ formolé	R ₂ chauffé	O 901	Manhattan	Para A rough	Para B rough
		1/4	1/16	1/2	1/16	1/2	1/16
Normal	1	0	0	0	0	0	0
R ₂ formolé	2	1.600	0	0	400	6.400	0
R ₂ chauffé	3	200	800	0	200	50	0
O 901	5	400	0	200	0	0	0
H 901	12	0	0	0	0	0	0
Manhattan	8	200	1.600	0	800	0	200
Ty 2	11	0	0	200	0	0	0
Para A rough	10	200	400	0	1.600	400	200

(1)

Tableau 26 (suite)

SERUMS		ANTIGENES BACTERIENS					
Anti	N°	R ₂ formolé	R ₂ chauffé	O 901	Manhattan	Para A rough	Para B rough
		1/4	1/16	1/2	1/16	1/2	1/16
Para B rough	14	400	800	0	400	200	200
Para B smooth	13	50	0	0	0	0	0

(1) Dilution d'antigène utilisée = unité d'antigène déterminée au tableau : 22.

Le chiffre 0 indique une réaction négative pour la dilution du sérum au 1/50.

Tableau 27

REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Force des sérums antibactériens

DILUTION LIMITE DU SERUM AVEC UNE UNITE D'ANTIGENE SOLUBLE

SERUMS		ANTIGENES SOLUBLES				
Anti	N°	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	O.B.
		1/160	1/80	1/160	1/2	1/4
Normal	1	0	0	0	0	0
R ₂ formolé	2	0	0	200	200	0
R ₂ chauffé	3	0	0	0	0	0
O 901	5	0	0	200	-	50
H 901	12	0	0	0	0	0
S. Manhattan	8	0	0	200	0	0
Ty 2	11	0	0	0	0	200
Para A rough	10	0	0	200	0	0
Para B rough	14	0	0	400	0	0
Para B smooth	13	0	0	0	0	0

(1) Dilution d'antigène utilisée = unité d'antigène déterminée au tableau : 25

Le chiffre 0 indique une réaction négative pour la dilution du sérum au 1/50.

Tableau 28

REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Force des sérums anti toxiques

DILUTION LIMITE DU SERUM AVEC UNE UNITE D'ANTIGENE BACTERIEN

SERUMS		ANTIGENES BACTERIENS					
Anti	N°	R ₂ formolé	R ₂ chauffé	O 901	Manhatt.	Para A rough	Para B rough
		1/4	1/16	1/2	1/16	1/2	1/16
R2 - B	7	800	800	0	800	200	200
R2 - T	4	1.600	800	0	400	400	800
R2 - P1	21	200	200	0	200	0	100
R2 - P2	22	0	0	0	0	0	0
R2 - P3	15	200	200	0	1.600	200	200
R2 - P4	16	50	800	0	800	6.400	400
Antigène O Boivin	6	200	0	400	0	0	0

(1) Dilution d'antigène utilisée = unité d'antigène déterminée au tableau 22.

Tableau 29

REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Force des sérums anti toxiques

DILUTION LIMITE DU SERUM AVEC UNE UNITE D'ANTIGENE SOLUBLE

SERUMS		ANTIGENES SOLUBLES				
Anti	N°	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	O.B.
		1/160	1/80	1/160	1/2	1/4
R2 - B	7	200	0	200	200	0
R2 - T	4	200	200	400	400	0
R2 - P1	21	200	50	200	0	0
R2 - P2	22	200	400	0	0	0
R2 - P3	15	0	0	3.200	1.600	0
R2 - P4	16	0	0	3.200	3.200	0
Antigène O Boivin	6	0	0	0	50	200

(1) Dilution d'antigène utilisée = unité d'antigène déterminée au tableau : 25

- 4 - Les différents sérums antitoxine R2 ne réagissent jamais avec l'antigène O de Boivin.

- 5 - Réciproquement, le sérum anti antigène O Boivin ne réagit pas avec nos différentes préparations de toxine R2, sauf avec la préparation P4. Le taux d'anticorps anti P4 de ce sérum n'est d'ailleurs pas très élevé, puisqu'au delà de la dilution au 1/50, le sérum ne réagit plus. Ces différentes constatations prouvent que nos préparations contiennent l'antigène rough.

- 6 - La préparation P3, à l'inverse des autres, réagit avec tous les sérums anti bactéries rough. Elle est donc la plus riche en antigène rough. Elle révèle la présence de cet antigène dans les bactéries O 901.

- 7 - Des réactions entre les sérums antitoxiques et les diverses préparations R2, il ressort que celles-ci sont complexes et renferment plusieurs constituants antigéniques :

Le produit P1 contient au moins trois antigènes :

- 1° un antigène commun avec P2, qui est absent dans les produits P3 et P4 (réactions sérum P2 - antigènes P3 et P4 négatives et réciproquement réactions sérums P3 et P4 - antigène P2 négatives)

- 2° un antigène présent dans P3 et absent dans P4 (réactions sérum anti P1 avec P3 et P4).

- 3° un antigène commun aux produits P3 et P4. Cet antigène doit se trouver masqué ou en quantité trop faible dans le produit P1, (réaction sérum P1 - antigène P4 négative) et n'est décelé que par les anticorps présents dans les sérums anti P3 et anti P4.

Le produit "T" contient aussi tous ces antigènes.

- 8 - L'antigène flagellaire ne semble pas provoquer la formation d'anticorps fixant le complément, ou très peu. Les sérums anti bactéries H 901 et Ty 2, riches en agglutinines H (d), réagissent très peu avec les bactéries flagellées R2 formolées et *S. Manhattan* (plus de fixation quand les sérums sont dilués au delà du 1/50) et ne réagissent pas avec les préparations P1 et P2 contenant cet antigène. Au contraire la présence d'anticorps anti-antigène R est facile à détecter par les réactions de fixation du complément.

- REACTIONS DE PRECIPITATION

I - Recherche de la dilution limite de l'antigène

- Technique

Nous avons pris comme solution mère d'antigène une solution contenant 5 milligrammes de substance sèche par millilitre. Cette concentration a été choisie arbitrairement. Les dilutions ont été faites en solution physiologique (NaCl 8,5 p. 1.000). Les sérums ont été utilisés purs.

Les réactions ont été faites en mélangeant 0,2 ml de sérum pur et 0,2 ml de dilution d'antigène.

Nous avons toujours effectué deux lectures : une première lecture après séjour de 4 heures au bain-marie à 45°, une deuxième lecture de contrôle après une nuit à la glacière 0° +4°.

- Résultats

Les résultats sont rapportés dans les tableaux 30 et 31 sous la forme de l'inverse de la dilution limite d'antigène qui, mélangée à un égal volume de sérum, donne un précipité visible à l'oeil nu.

Ces résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

- 1 - Les sérums antibactériens préparés avec les bactéries en forme rough, précipitent toujours plusieurs de nos préparations R2 ; le sérum anti-para A rough les précipite toutes. Ils ne précipitent pas l'antigène O Boivin.

- 2 - Les sérums antibactériens smooth ne précipitent pas nos préparations R2, sauf le sérum anti H 901 et le sérum anti para B smooth qui précipitent la seule préparation "a".

- 3 - Les sérums obtenus avec les différentes préparations toxiques R2 ne précipitent jamais l'antigène O Boivin et réciproquement, le sérum anti-antigène O Boivin ne précipite pas les différents antigènes toxiques R2, non plus que le sérum anti bactéries O 901.

- 4 - Les sérums antitoxiques réagissent différemment avec les divers antigènes. Ceci confirme la complexité antigénique de ces produits déjà notée avec les réactions de fixation du complément. On constate la parenté des antigènes "P1" et "P2" entre eux et la parenté des antigènes "P3" et "P4" entre eux.

- 5 - La préparation "a" réagit fortement avec les sérums antitoxiques R2 et avec les sérums antibactériens R2 chauffées, *S. Manhattan*, *S. paratyphi A* rough, *S. paratyphi B* rough et smooth.

Tableau 30
PRECIPITATIONS
SERUMS ANTI-BACTERIENS

SERUMS		ANTIGENES							
Anti.	N°	B.	T.	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	a	O.B.
Normal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
R2 formolé	2	500	-	0	0	10	200	50	0
R2 chauffé	3	0	-	0	0	50	100	100	0
O 901	5	-	-	0	0	0	0	0	1.000
H 901	12	-	-	0	0	0	0	50	-
Manhattan	8	500	-	400	400	0	0	100	0
Ty 2	11	-	-	0	0	0	0	0	-
Para A rough	10	10	200	200	200	400	200	500	0
Para B rough	14	-	-	0	0	20	400	300	-
Para B smooth	13	-	-	0	0	0	0	200	-
R2 formolé	787	200	200	-	-	-	-	20	0
R2 chauffé	862	100	200	-	-	-	-	50	0
Rauss 965	27	-	-	-	-	-	-	0	-

Ces résultats confirment que la toxine R2 est distincte des antigènes O et VI et qu'elle est au contraire étroitement associée à l'antigène rough de *S. typhi* qui est commun à *S. Manhattan*, *S. paratyphi A -R* et à *S. paratyphi B*.

La recherche de la dilution limite de l'antigène permet de comparer différents antigènes entre eux par rapport à un sérum donné. Elle ne fournit, par contre, qu'une indication très approximative sur la richesse comparée des différents sérums en anticorps (MARTIN 180). Pour étudier celle-ci, il faut avoir recours aux techniques de précipitation quantitative. La recherche de la dilution limite des sérums, pour la dilution limite d'antigène, permet aussi une certaine comparaison des sérums à ce point de vue.

Tableau 31
PRECIPITATIONS
SERUMS ANTI-TOXIQUES

SERUMS		ANTIGENES							
Anti.	N°	B.	T.	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	a	O. B.
R ₂ - B	7	500	2.000	50	50	0	0	200	0
R ₂ - T	4	200	1.000	800	1.600	800	3.200	1.000	0
R ₂ - P ₁	21	-	-	100	50	0	0	200	0
R ₂ - P ₂	22	-	-	50	50	0	0	100	0
R ₂ - P ₃	15	-	-	0	0	400	400	500	0
R ₂ - P ₄	16	-	-	0	0	200	200	-	0
R ₂ - a	25 26	100	-	-	-	-	-	500	-
Antigène O.B.	6	0	0	0	0	0	0	0	1.000
R ₂ - B	704	100	200	-	-	-	-	100	0
R ₂ - T	92	20	50	-	-	-	-	50	-
R ₂ - T	107	200	200	-	-	-	-	-	-
Fraction P.C.	659	100	10	-	-	-	-	-	-

II - Recherche de la dilution limite du sérum

Nous avons effectué cette recherche pour quelquesuns de nos sérums seulement.

- Technique

On a recherché dans un premier temps la dilution limite de l'antigène donnant un précipité en présence d'un égal volume de sérum pur. Cette dilution limite d'antigène ainsi déterminée est alors mise en présence de dilutions croissantes du sérum en solution physiologique. La réaction et les lectures sont faites dans les mêmes conditions que précédemment.

- Résultats

Les résultats obtenus sont donnés au tableau 32. On constate que le sérum de cheval anti R₂ - B N° 704 est moins riche en précipitines que les sérums antibactériens (chevaux 787 et 862).

Les sérums de lapin N° 25 et N° 26 obtenus avec deux préparations "a" différentes, dont l'une était beaucoup moins toxique que l'autre, contiennent des quantités équivalentes de précipitines (anti "a").

Tableau 32
PRECIPITATIONS

RECHERCHE DE LA DILUTION LIMITE DU SERUM
POUR LA DILUTION LIMITE DE L'ANTIGENE

SERUMS		ANTIGENES	Dilution limite de l'antigène	Dilution limite du sérum
Anti	N°			
R ₂ - T	4	R ₂ - T	1.000	40
R ₂ - B	704	R ₂ - T	200	10
Germes R2 formolés	787	R ₂ - T	200	40
Germes R2 chauffés	862	R ₂ - T	200	30
R ₂ - a	25	R ₂ - a	500	100
R ₂ - a	26	R ₂ - a	500	100

Si on compare les trois séries de réactions précédentes : agglutinations, fixation du complément, précipitations, on constate qu'elles apportent des renseignements différents qui se complètent.

Les réactions d'agglutination mettent facilement en évidence la présence de l'antigène flagellaire H (d) pour lequel les taux d'agglutinines sont toujours plus élevés que ceux des agglutinines O et R. Par contre cet antigène ne semble pas provoquer la formation d'anticorps fixant le complément, ni de précipitines. Le sérum anti H 901 et le sérum anti Ty 2, riches en agglutinines H (d), réagissent très peu avec les bactéries flagellées R2 formolées et *S. Manhatan* et ne donnent ni fixation du complément, ni précipitation avec les préparations P1 et P2 contenant cet antigène.

Au contraire, la présence des anticorps R est facile à détecter par les réactions de fixation du complément.

Les réactions de précipitation et de fixation du complément ne donnent pas toujours des résultats superposables avec les différentes préparations R2 du fait de la complexité antigénique de celles-ci ; par contre, ces deux types de réactions concordent parfaitement en ce qui concerne l'absence totale de réaction croisée entre l'antigène O Boivin et les sérums anti-toxine R2.

- PRECIPITATION QUANTITATIVE

Nous avons étudié quelques uns de nos sérums par la méthode de précipitation quantitative de HEIDELBERGER & KENDALL (130):

- 1/Principe de la méthode

On met en présence d'une quantité fixe de sérum des quantités variables d'antigène, puis on recueille les précipités formés et on en dose l'azote total.

On trace la courbe de précipitation en portant en abscisses les quantités d'antigène utilisées et en ordonnées l'azote des précipités obtenus. Au début, la quantité d'azote du précipité augmente avec la quantité d'antigène ; elle atteint un maximum quand tous les anticorps du sérum sont précipités, puis elle diminue par suite de la formation de complexes antigène - anticorps solubles dans l'excès d'antigène.

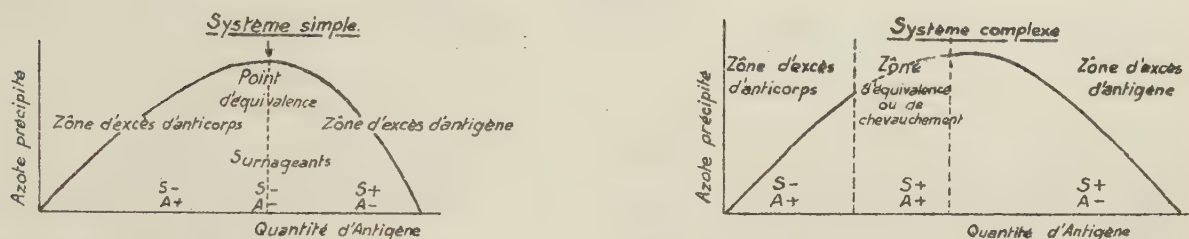
Dans la courbe théorique (figure 18) correspondant à un système simple, au début de la courbe (partie ascendante), la précipitation se fait en présence d'un excès d'anticorps, décelable dans le surnageant ; lorsque tout l'antigène s'est combiné avec tous les anticorps, il y a équivalence, c'est le point maximum de la courbe dit "point d'équivalence". Après ce point (partie descendante), la précipitation se fait en présence d'un excès d'antigène.

Lorsque le système est complexe, c'est-à-dire lorsque l'antigène renferme plusieurs constituants antigéniques, les points d'équivalence correspondant à ces différents constituants

ne coïncident naturellement pas, les zones d'excès d'antigène et d'excès d'anticorps des différents systèmes chevauchent. On a alors une zone d'équivalence" ou "zone de chevauchement".

Figure 13. PRECIPITATION QUANTITATIVE

Courbes théoriques



- 2/Technique utilisée

Dans une série de tubes à centrifuger, on répartit :

Sérum pur ou dilué	1 ml
Antigène : quantités croissantes	de 0,025 à 5 mg
en solution en eau physiologique	
Tampon boraté M/50 (+ NaCl 8,57 p. 1.000)	1 ml
(pH = 7,32)	
Eau physiologique . . . Q.S.P. volume total	3 ml

Nous préparons deux tubes identiques pour chaque quantité d'antigène. Le sérum de cheval a été utilisé pur, le sérum de lapin a été préalablement dilué au 1/5 ou au 1/2 dans le tampon boraté identique. Le sérum et la solution d'antigène ont été centrifugés à grande vitesse à froid avant l'emploi.

Les mélanges ainsi préparés et bien agités sont maintenus pendant trois heures dans un bain-marie à 45°, puis laissés trois jours en glacière 0° +4°. On centrifuge ensuite à 0° (centrifugeuse refroidie) pendant 10 minutes à 10.000 t/m et on décante avec précaution.

Etude des surnageants

Le surnageant de chaque tube est mis en contact, d'une part avec du sérum, d'autre part avec une solution d'antigène, dans des tubes étroits, et en ayant bien soin de superposer les deux liquides mis en présence sans les mélanger. Lorsque la réaction dite "épreuve de l'anneau" ou "du disque" (ring test) est positive, il se forme à la surface de séparation des deux couches un disque de précipité.

Si l'épreuve est positive en présence du sérum : il y a excès d'antigène dans le surnageant. Si l'épreuve est positive en présence de l'antigène : il y a excès d'anticorps. Si l'épreuve est positive dans les deux cas, le point correspondant se trouve dans la zone de chevauchement. Si l'épreuve est négative dans les deux cas, on est au point d'équivalence.

Nous avons aussi recherché l'excès d'antigène et d'anticorps des surnageants par la précipitation spécifique en gel que nous décrirons plus loin. Cette méthode est moins sensible que la méthode de l'anneau.

Etude des précipités

Les précipités recueillis sont lavés trois fois à 0° avec 2 ml de solution physiologique et centrifugés chaque fois 10 minutes à 10.000 t/m, puis redissous par quelques gouttes de solution N/10 de soude et transvasés avec précaution dans des matrass, avec trois rinçages du tube à l'eau distillée. L'azote est dosé par la méthode de micro Kjeldahl.

- 3/Résultats

Nous avons tracé les courbes correspondant à la précipitation de différents lots de préparation "a" par les deux sérums 25 et 26 de lapins immunisés avec la préparation "a", et par le sérum du cheval 704 immunisé avec l'extrait brut.

Les protocoles de ces expériences sont portés sur les tableaux 33, 34, 35 et les courbes obtenues sont reproduites sur les figures 19, 20, 21. Les courbes obtenues avec le sérum N° 25 préparé avec une préparation toxique "a" très impure, et le sérum N° 704 préparé avec l'extrait brut, présentent une zone de chevauchement très large, ce qui prouve la complexité des systèmes antigéniques étudiés. Les courbes obtenues avec le sérum N° 26 ont une zone de chevauchement beaucoup moins large.

PRECIPITATION QUANTITATIVE

Tableau 33

SERUM 25 - PREPARATION TOXIQUE a (N° 8.050)

(Sérum dilué à 1/5)

Points de la courbe	Poids d'antigène en mg.	Azote d'antigène en μ g.	Azote total précipité en μ g.	Excès de	
				Anti-gène	Anti-corps
1	0,125	9,3	27	0	+
2	0,25	18,7	59	+	+
3	0,50	37,4	86	+	+
4	1,25	93,5	112	++	0
5	2,50	187	88	++	0
6	5	374	15	++	0

Tableau 34

SERUM 26 - PREPARATION TOXIQUE a (N° 8.110)

(Sérum dilué au 1/2)

Points de la courbe	Poids d'antigène en mg.	Azote d'antigène en μ g.	Azote total précipité en μ g.	Excès de	
				Anti-gène	Anti-corps
1	0,25	16,5	84	0	++
2	0,50	33	126	+	+
3	0,75	49,5	158	+	0
4	1	66	178	++	0
5	2	132	150	++	0
6	4	264	72	++	0

PRECIPITATION QUANTITATIVE

Figure 19.

SERUM N° 25 - PREPARATION TOXIQUE a (N° 8.050)

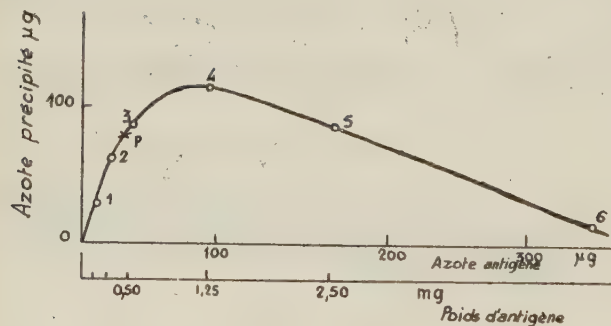
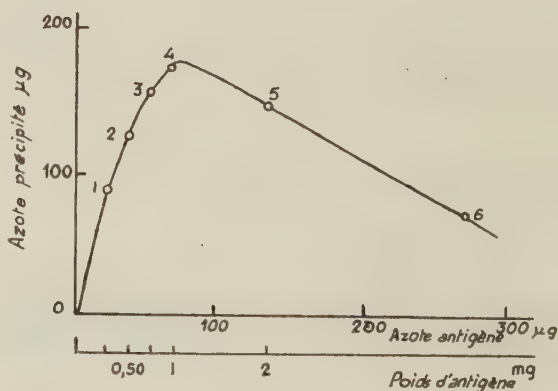


Figure 20

SERUM N° 26 - PREPARATION TOXIQUE a (N° 8.110)



On remarque que la quantité d'anticorps précipités est très faible par rapport aux quantités d'antigène utilisées. Ceci fait supposer qu'une partie seulement de ces préparations précipite avec le sérum.

Nous verrons plus loin comment ces courbes nous ont servi aussi à rechercher le pouvoir neutralisant de ces sérums vis-à-vis de la toxine R2.

Tableau 35

PRECIPITATION QUANTITATIVE

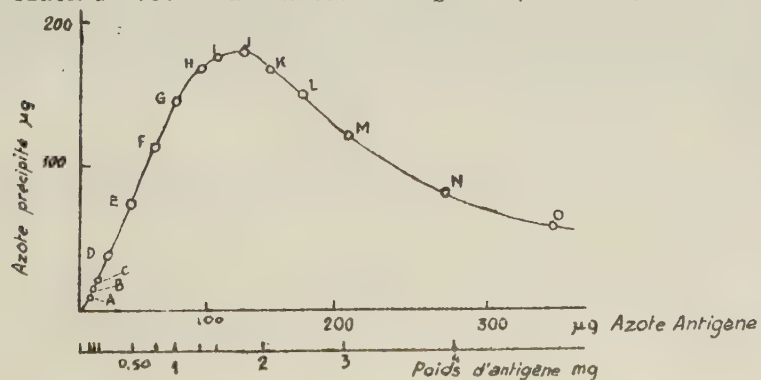
Sérum 704 - Préparation toxique a (N° 8.050).

Points de la courbe	Poids d'Antigène en mg	Azote d'Antigène en μ g	Azote total précipité en μ g	Excès de	
				Antigène	Anticorps
A	0,025	1,6	4	0	+
B	0,050	3,3	8	0	+
C	0,100	6,7	16	+	+
D	0,250	16,8	38	+	+
E	0,500	33,6	76	+	+
F	0,800	53,1	118	+	+
G	1	67	153	+	±
H	1,25	84	174	+	±
I	1,50	100	187	+	±
J	1,80	120	190	+	0
K	2	134	186	+	0
L	2,50	167	156	+	0
M	3	201	121	+	0
N	4	266	86	+	0
O	5	335	65	+	0
P	10	670	28	+	0

Figure 21

PRECIPITATION QUANTITATIVE

SÉRUM N° 704 - PRÉPARATION TOXIQUE a (N° 8.050)



- PRECIPITATION SPECIFIQUE EN GEL

Nous avons étudié la précipitation spécifique de nos antigènes avec la méthode de précipitation en milieu gélifié inaugurée par OUDIN (215 - 216).

- 1 - Principe de la méthode

OUDIN superpose dans un tube du sérum gélifié et une solution d'antigène ; l'antigène diffuse dans la couche de sérum gélifié et il précipite avec le sérum en donnant autant de disques de précipité qu'il y a de constituants antigéniques présents en proportion convenable.

OAKLEY & FULTHORPE (206) ont utilisé une technique un peu différente. Ils intercalent entre le sérum gélifié et la solution d'antigène une couche intermédiaire de gélose pure dans laquelle diffusent antigènes et anticorps et se forment les bandes de précipité. C'est la méthode par *double diffusion*.

Nous avons utilisé cette dernière selon les modalités rapportées par RELYVELD (242).

- 2 - Techniques

a) Technique d'OAKLEY - FULTHORPE

Le sérum gélifié est réparti au fond de tubes à hémolyse (8 x 100 mm) sur une hauteur de 10 mm. Une couche intermédiaire de gélose pure est coulée au-dessus sur une hauteur de 20 mm. On verse ensuite 0,5 ml de solution de l'antigène à étudier (couche supérieure non gélifiée). Dans tous les produits ainsi répartis, la stérilité est assurée par addition de merthiolate (concentration finale 1 pour 10.000).

La gélose utilisée est préalablement lavée à l'eau distillée. La concentration finale de gélose dans les milieux gélifiés (couches inférieure et intermédiaire) est de 0,75 g p. 100.

La concentration finale du sérum dans la couche gélifiée est de 50 pour 100.

Pour l'étude d'un antigène donné, il est nécessaire de faire une série de tubes avec des solutions de cet antigène à différentes concentrations. En effet, certains constituants antigéniques accessoires en concentration faible peuvent ne se manifester par une bande de précipité que pour des concentrations distinctes de la concentration optima (équivalence) pour l'antigène principal. Nous avons choisi arbitrairement la concentration de 10 mg par ml pour la solution-mère d'antigène qui subissait ensuite une série de dilutions en eau physiologique. (Voir figures 22 et 23).

Les tubes ainsi préparés sont soigneusement bouchés, pour éviter l'évaporation et placés dans une chambre étuve à la température de 35°. On peut ainsi les examiner sans modifier la température. Ils sont retirés et photographiés sur fond noir au bout de 15 jours en moyenne.

On peut admettre en première approximation que le nombre de bandes apparues dans la couche intermédiaire correspond à autant de constituants antigéniques distincts.

Nous avons également utilisé la méthode de double diffusion pratiquée, non plus en tubes, mais en boîtes de Pétri, selon la technique d'OUCHTERLONY (150 et 207 à 214).

b) Technique d'OUCHTERLONY

On coule en boîte de Pétri une solution de gélose, lavée comme précédemment, à la concentration de 1,5 g pour 100. Lorsque la gélose est prise, on pratique à l'emporte pièce des petites cuves dans lesquelles sont répartis les sérums et solutions d'antigène. On met 0,2 ml de sérum ou de solution d'antigène par trou. (Voir figures 24 et 25).

La stérilité de la gélose et des solutions (sérums et antigène) est assurée comme précédemment par addition de merthiolate à la concentration de 1 pour 10.000.

Nous pratiquons généralement une petite cuve au centre de la boîte de Pétri et quatre à six petites cuves sur la périphérie. Nous mettons au centre soit un sérum à étudier avec différents antigènes répartis autour, soit un antigène à étudier avec différents sérums. Il apparaît entre les cuves où sont répartis sérum et antigène autant de bandes qu'il y a de combinaisons antigène-anticorps. Cette méthode est moins sensible que la précédente quant à la détermination du nombre de ces constituants antigéniques, mais elle a le grand avantage de pouvoir comparer entre eux différents antigènes par rapport à un sérum, ou différents sérums par rapport à un antigène, et de déceler les anticorps ou les antigènes communs. Les systèmes différents donnent des bandes qui se croisent (Voir figures 24 et 25), les systèmes communs des bandes qui se raccordent entre elles.

PRECIPITATION SPECIFIQUE EN GEL (technique d'Oakley - Fulthorpe)

Figure 22

SERUM N° 704 - PREPARATION TOXIQUE a

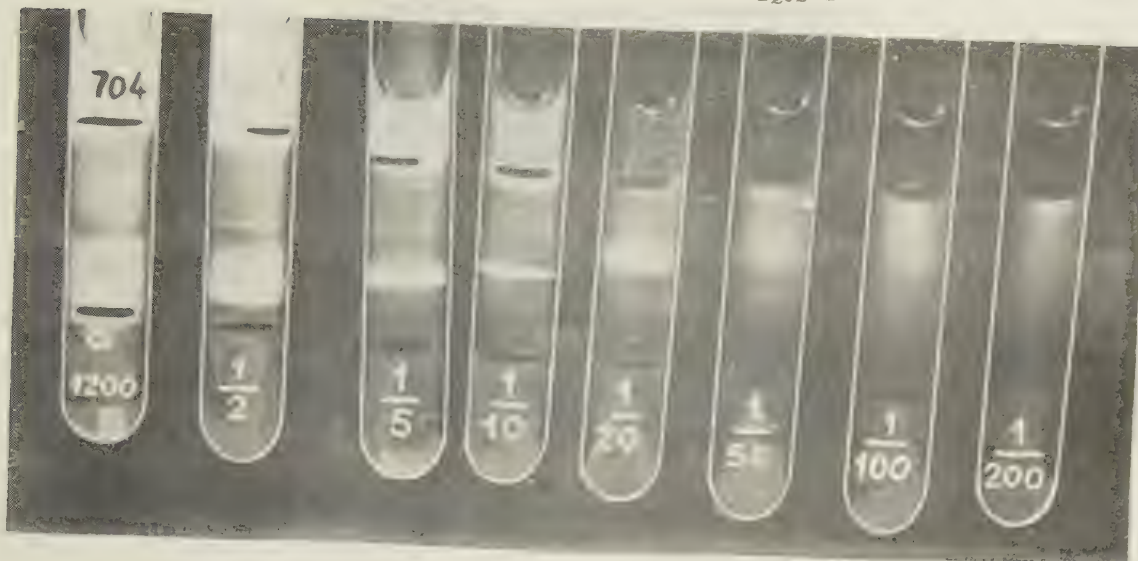


Figure 23

SERUM N° 26 - PREPARATION TOXIQUE a



- 3 - Résultats

Nous avons étudié les différents stades de préparation de la toxine R2 : extrait brut, préparation P1 (obtenue par précipitation acétique) et préparation "a" (obtenue par dissociation alcaline et précipitation alcoolique) avec le sérum du cheval n° 704 immunisé avec l'extrait brut et avec le sérum de lapin n° 26 immunisé avec la préparation "a". Les résultats donnés par ces 2 sérums sont comparables. Ils montrent que ces précipitations successives permettent de réaliser une certaine purification (au moins 6 antigènes dans l'extrait brut et 4 dans la préparation R2 "a"). Cependant la préparation finale de toxine ("a") reste complexe et contient encore 4 constituants antigeniques (voir figures 22 et 23). On vérifie sur ces figures l'influence connue de la concentration de l'antigène sur le nombre de bandes perceptibles. La préparation "a" a été étudiée selon la technique d'Oakley avec une série de sérums différents.

PRECIPITATION SPECIFIQUE EN GEL
Technique d'Ouchterlony

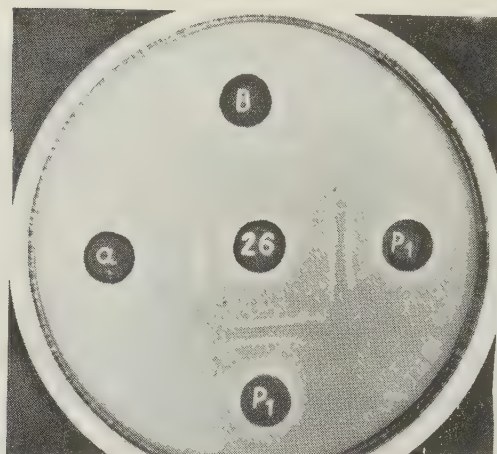


Figure 24.

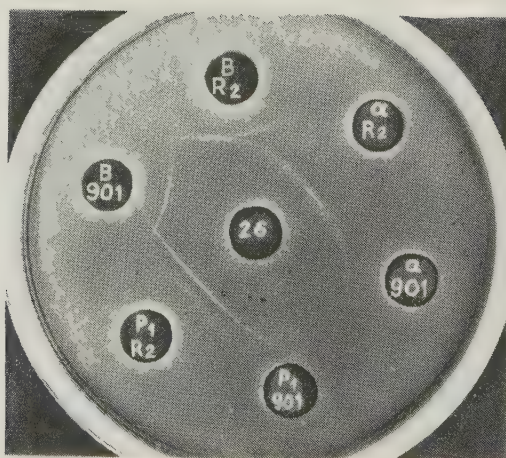


Figure 25.

Pour une raison de commodité, et étant donné les petites quantités dont nous disposions pour certains sérums, nous avons ici gélifié l'antigène qui est réparti au fond des tubes et distribué les sérums liquides à la couche supérieure. Nous avons utilisé une solution d'antigène à 10 mg par ml de manière à avoir une concentration finale de 5 mg par ml (dilution au 1/2 dans la gélification).

La même étude a été faite selon la technique d'Ouchterlony.

Les résultats de ces études mettent en évidence :

- 1) - L'absence d'anticorps anti-antigène R2 - "a" dans les sérums antibactériens 0 901 (N° 5) et anti fraction P.C. (N° 659).
- 2) - La présence de ces anticorps dans les sérums suivants :
 - sérums anti bactéries R2 formolées (N° 2), R2 chauffées (N° 3), *S. Manhattan* (N° 8) *S. paratyphi A' rough* (N° 10),
 - sérums anti toxine R2 : sérum de lapin anti R2 - B (N° 7) et sérum de cheval anti R2 - B (N° 704), sérum de lapin anti R2 - T (N° 4) et sérums de chevaux anti R2 - T (N° 92 et 107), sérum de lapin anti R2 - P1 (N° 21), sérum de lapin anti R2 - a (N° 25).

Dans cette étude, les résultats donnés par les deux techniques d'Oakley et d'Ouchterlony sont comparables, mais on note quelques différences. :

1) - On vérifie la plus grande sensibilité de la technique d'Oakley : le nombre de systèmes antigéniques décelables est plus grand dans les tubes que dans les boîtes. Cependant ce nombre est difficile à déterminer avec une seule concentration de l'antigène. Pour préciser le nombre de constituants antigéniques de la préparation "a" correspondant aux sérums antibactériens R2 formolés (sérum N° 2) et antibactériens R2 chauffés (sérum N° 3), nous avons fait l'étude de ces sérums gélifiés avec différentes concentrations de la préparation "a". Le sérum anti R2 formolé donne trois bandes et le sérum anti R2 chauffé n'en donne qu'une seule.

2) - Le sérum 6 anti-antigène 0 Boivin a donné une réaction négative avec l'antigène R2 "a" avec la technique d'Ouchterlony et une réaction faiblement positive avec la technique d'Oakley. Nous avons vérifié cette réaction douteuse en la refaisant avec une série de concentrations différentes de la préparation "a", et nous avons constaté la présence de trois bandes de précipite. Le fait que le sérum 6 anti-antigène 0 extrait par l'acide trichloracétique selon Boivin contienne des anticorps réagissant avec la préparation "a" montre que la préparation d'antigène 0 obtenue par cette technique est hétérogène et qu'elle contient de l'antigène rough. Cet antigène rough est masqué par l'antigène 0 chez les bactéries smooth intactes : le sérum 5 anti bactéries 0 901 ne réagit pas avec l'antigène R2-"a". On sait en effet que les souches smooth contiennent de l'antigène rough (Béguin (12,13)) et que Boivin a noté la présence d'antigène rough dans la fraction non ultra-centrifugable de son antigène 0 (44).

Réciproquement, nous avons étudié le sérum anti R2-B (cheval N° 704) et le sérum anti R2 "a" (lapin N° 26) avec l'antigène 0 extrait par l'acide trichloracétique. Les réactions sont négatives. La quantité d'antigène rough contenue dans l'antigène 0 Boivin est probablement trop faible pour donner une précipitation visible. Elle ne peut être décelée que par les anticorps suscités par l'immunisation (sérum anti 0 Boivin n° 6).

Les réactions entre l'antigène R2 "a" et un sérum anti antigène Vi d'une part, et entre un antigène Vi et les sérums anti toxine R2 (N° 704 et 26) d'autre part, ont été complètement négatives. Ceci confirme l'absence totale d'antigène Vi dans nos préparations de toxine R2.

Les deux sérums anti-toxine R2 n° 704 et 26 ont également été étudiés avec une série d'antigènes extraits de variantes smooth et rough des espèces suivantes : *S. typhi* H 901, *S. typhi* 0 901, *S. para typhi A*, *S. paratyphi B*. Ces antigènes ont été simplement extraits des bactéries par la solution hypertonique NaCl-citrate, lyophilisés après dialyse, puis remis en solution dans l'eau physiologique à raison de 5 mg par ml. L'étude faite avec le sérum N° 704 en tubes (technique d'Oakley) montre l'existence de plusieurs antigènes communs entre les préparations toxiques R2 et ces différentes préparations. L'étude faite en boîtes d'Ouchterlony avec les sérums N° 704 et N° 26 montre l'existence d'au moins un antigène commun à toutes ces préparations provenant de diverses Salmonelles.

La précipitation spécifique en gel révèle aussi l'existence d'un antigène commun avec *Shigella Shigae*. En effet, l'antigène R2 "a" réagit avec un sérum anti-anatoxine Shiga (sérum N° 24) et réciproquement la préparation toxique extraite de *Shigella Shigae* en forme rough (souche Bucarest) réagit avec les sérums anti toxine R2 (N° 704 et 26). La comparaison de ces systèmes antigéniques par la méthode d'Ouchterlony montre que le constituant commun n'est pas le constituant principal ni de la préparation toxique R2 "a", ni de la préparation toxique Shiga.

Etude des fractions de la préparation toxique R2 "a" séparées par ultra-centrifugation.

Etudiées par la technique d'Oakley en présence du sérum anti R2-B N° 704, les fractions de la préparation toxique "a", séparées par ultra-centrifugation, se montrent toutes antigéniquement complexes (en ne tenant pas compte de la fraction F1, à laquelle le manque de toxicité enlève tout intérêt).

La fraction F2, sédimentée à 25.000 g, renferme deux constituants, la fraction F3, sédimentée à 100.000 g, en contient au moins trois, la fraction F4, non sédimentée à 100.000 g présente au moins quatre constituants.

La comparaison de ces fractions entre elles et avec la préparation "a" par la méthode d'Ouchterlony montre qu'il existe un constituant commun aux trois fractions, lequel est le constituant principal de la préparation "a".

On constate qu'aucune des fractions isolées ne représente un antigène pur et que la fraction F4 non sédimentée par ultra-centrifugation semble la plus complexe.

CHAPITRE III

POUVOIR VACCINANT

Les injections répétées de toxine à l'animal (cheval, lapin, souris) provoquent la formation d'anticorps antitoxiques. Nous verrons dans le cours de cette étude que l'immunité antitoxique acquise est variable selon l'espèce animale.

- IMMUNITE PASSIVE

- I - Etude du pouvoir antitoxique des sérums

Le pouvoir antitoxique des sérums a été recherché en ajoutant à une ou deux doses minima mortelles de toxine des volumes variables de sérum. Les mélanges après un certain temps de contact à 37°, sont inoculés à la souris par voie intrapéritonéale. Nous inoculons toujours plusieurs souris par dose de sérum, généralement huit. Nous avons fait varier le temps de contact toxine - sérum à 37° : pour certaines expériences, il a été de 2 heures, pour les autres de 15 à 18 heures ; nous n'avons pas constaté de différence notable dans le pouvoir neutralisant des sérums ; mais la solution de toxine pure témoin placée également à l'étuve subit une légère perte de toxicité lorsque le séjour à 37° est prolongé et les animaux témoins ne meurent plus tous.

Nous avons recherché le pouvoir antitoxique du sérum de lapin anti-toxine R2 (anti R2-B N° 7). Celui-ci est très faible, à peine supérieur à celui observé avec un sérum de lapin normal. Bien que le lapin acquiert par immunisation une résistance certaine vis-à-vis de la toxine - nous l'avons noté au cours de l'étude de la préparation des sérums - son sérum est pauvre en anticorps protecteurs. Le lapin étant mauvais producteur d'antitoxine, en général, et étant donné les quantités relativement faibles de sérum de lapin dont nous disposions, nous n'avons pas continué les recherches avec le sérum de lapin, et avons fait cette étude avec nos sérums de chevaux.

Nous donnons à titre d'exemple le détail de deux de ces expériences (tableaux 36 et 37) et nous indiquons en résumé (tableau 38) un certain nombre de résultats obtenus avec des protocoles semblables.

On constate que le sérum antitoxine R2 (anti R2-B) N° 704 est doué de pouvoir protecteur vis-à-vis de la toxine R2, de même que le sérum anti bactéries R2 formolées (N° 787). Les sérums anti toxine R2 (R2 T) N° 92 et N° 107 paraissent avoir aussi un faible pouvoir protecteur⁽¹⁾. Le sérum anti bactéries R2 chauffées (N° 362), par contre ne protège pas plus qu'un sérum normal de cheval. On remarque que le pouvoir protecteur du sérum N° 704 s'exerce non seulement vis-à-vis de la toxine R2, mais encore vis-à-vis de la toxine extraite des bactéries *S. paratyphi A* en forme rough.

(1) On voit que le pouvoir protecteur est indépendant du taux des agglutinines. Les sérums 92 et 107 plus riches en agglutinines, protègent moins bien que le sérum 704 (Bonnefoi (54)).

Tableau 36

POUVOIRS PROTECTEURS COMPARES
des Sérums anti-bactériens et anti-toxiques vis-à-vis de la toxine R₂

Doses de sérum en ml	SURVIES / NOMBRE TOTAL INOCULE						
	Témoins sans sérum	Témoins sérum normal	Sérums anti-bactéries R ₂		Sérums anti-toxine R ₂		
			Formolées 787	Chauffées 862	R ₂ -B 704	R ₂ -T 92	R ₂ -T 107
0	3/8	-	-	-	-	-	-
0,20	-	1/8	4/8	2/8	2/8	-	5/8
0,40	-	2/8	6/8	1/8	2/8	5/8	4/8
0,80	-	3/8	5/8	1/8	5/8	6/8	4/8
1,20	-	2/8	7/8	0/8	7/8	2/8	3/8
1,60	-	2/8	7/8	3/8	7/8	3/8	6/8
2,00	-	3/8	7/8	4/8	8/8	2/8	3/8
Survie totale %	37,5 %	27 %	75 %	22,9 %	64,6 %	45 %	52 %

Contact toxine-sérum 18^h à 37°.

Tableau 37

POUVOIR PROTECTEUR DU SERUM 704
(Sérum cheval anti-toxine R₂)
vis-à-vis de la toxine de *S. para A rough*

Doses de sérum en ml	SURVIES / NOMBRE TOTAL		
	Témoins sans sérum	Témoins sérum normal	Sérum 704
0	2/8	-	-
0,5	-	2/8	8/8
1	-	5/8	5/8
1,5	-	1/8	7/8
2	-	2/8	8/8
Survie totale %	25 %	31 %	87,5 %

Contact toxine-sérum 15^h à 37°

Tableau 38

POUVOIRS PROTECTEURS COMPARES des
Sérums de chevaux anti-bactériens et anti-toxiques

Nature et n° de la préparation	SOURIS SURVIVANTES EN % DES SOURIS INOCULEES						
	Sans Sérum	Sérum normal	Sérums anti-bactéries R ₂		Sérums anti-toxine R ₂		
			Formolées 787	Chauffées 862	R ₂ -B 704	R ₂ -T 92	R ₂ -T 107
R ₂ -B - n° 14	0	25	-	-	66	-	-
R ₂ -B - n° 16	0	0	-	-	75	-	-
R ₂ -B - n° 3.00	0	0	33	-	63	-	-
R ₂ -T - n° 3.085	25	21	53	21	47	-	-
(1) R ₂ -T - n° 3.110	37	27	75	23	65	45	52
R ₂ -P ₁ - n° 4.050	0	37	50	-	-	75	63
(2) Para A.R.	25	31	-	-	87	-	-

(1) - Expérience portée dans le tableau 36

(2) - Expérience portée dans le tableau 37

Nous devons mentionner que ce pouvoir protecteur reste toujours faible : il ne protège que contre un très petit nombre de doses mortelles et il ne protège pas régulièrement tous les animaux, même en augmentant la dose de sérum.

- 2 - Pouvoir neutralisant des sérums.

Le pouvoir neutralisant des sérums a été déterminé en inoculant non plus le mélange toxine-sérum, mais seulement le précipité spécifique obtenu dans des conditions déterminées.

Nous avons préparé une certaine quantité de précipité spécifique en faisant les mélanges toxine-sérum antitoxique dans les proportions correspondant à un ou plusieurs points de la courbe de précipitation quantitative. Le précipité obtenu dans des conditions identiques à celles fixées pour l'établissement de la courbe (contact 3 heures à 45° - 3 jours à 0° - 3 lavages à 0°) est remis en suspension en solution physiologique et inoculé à la souris par voie intrapéritonéale.

Le précipité obtenu avec le sérum anti "a" N° 25 au point P de la courbe de précipitation (figure 19), situé dans la zone de chevauchement (épreuve de l'anneau) est encore toxique (voir tableau 39). A ce point de la courbe, la toxine n'est pas entièrement neutralisée.

Si on injecte en même temps que le précipité spécifique et le lendemain, 0,5 ml de sérum N° 25 pur, on obtient un taux de survie notablement plus élevé (tableau 40). Ce résultat peut être interprété de la manière suivante : On sait que la préparation toxique "a" est antigéniquement complexe, le constituant principal qui donne le point de précipitation maxima observé sur la courbe, ne serait pas le principe toxique. Celui-ci ne représenterait qu'une portion réduite de la préparation et ne posséderait qu'un pouvoir antigène faible. Lorsqu'on est à l'équivalence ou en excès d'anticorps pour le constituant principal, on est déjà en zone d'excès d'antigène pour le système toxine-antitoxine. Il faudrait alors rechercher le précipité spécifique neutre tout au début de la courbe, en zone apparente d'excès d'anticorps.

Ne disposant pas d'une quantité suffisante de sérum N° 25, nous avons fait cette recherche avec le sérum de lapin anti "a" N° 26 en nous plaçant au point 1 de la courbe de précipitation (fig. 20) situé en zone excès d'anticorps (épreuve de l'anneau). Le taux de survie obtenu est plus élevé, néanmoins le précipité est encore toxique (tableau 41). Ceci laisserait supposer que la proportion du principe toxique dans la préparation antigénique, ou la quantité d'anticorps dans le sérum seraient trop faibles pour pouvoir être décelés par la méthode de l'anneau, et qu'on serait encore ici dans la zone excès d'antigène pour le système toxine - antitoxine.

Tableau 39

POUVOIR NEUTRALISANT DU SERUM 25
(Sérum de lapin anti-toxine R2)

PROTOCOLE DE L'EXPERIENCE

Mélange correspondant au point P de la courbe de précipitation (fig. 19, page 56).

Toxine R ₂ - préparation a 8.050	20 mg
Sérum n° 25	10 ml
Tampon Borate M/50 + NaCl	90 ml
Eau physiologique	50 ml

Séjour : 3^h. à 45° puis 3 jours à 0°.

Précipité recueilli par centrifugation, lavé 3 fois à l'eau physiologique à 0°, puis remis en suspension en eau physiologique q.s.p. 4 ml et injecté à la souris.

TOXICITE DU PRECIPITE TOXINE-ANTICORPS

DOSE INOCULEE			RESULTAT
Suspension de précipité en ml.	Poids de toxine en mg ⁽¹⁾	Nombre de D M M correspondant	<u>Survies</u> Nombre total
0,1	0,50	2	2/5
0,5	2,50	10	0/2
1,0	5	20	0/2

(1) quantité de préparation toxique "a" contenue dans la dose de précipité spécifique inoculée en supposant que toute la toxine utilisée est précipitée.

Tableau 40

POUVOIR NEUTRALISANT DU SERUM 25
Toxicité du Précipité toxine-anticorps obtenu au point P
de la courbe et inoculé avec un excès de sérum 25 pur
(Préparation toxique a n° 8.050)

DOSE INOCULEE			Sérum injecté simultanément et le lendemain ⁽²⁾	<u>Survies</u> Nombre total
Suspension de précipité en ml.	Poids de toxine en mg. ⁽¹⁾	Nombre de D M M correspondant		
0,1	0,50	2	0,5 + 0,75	4/6
0,2	1,0	4	0,5 + 0,75	5/6
0,5	2,50	10	0,5 + 0,75	1/3

(1) quantité de préparation toxique "a" contenue dans la dose de précipité spécifique inoculée.

(2) Injection de 0,5 ml de sérum pur en même temps que le précipité toxine-anticorps.

Le lendemain injection I.M. de 0,50 ml le matin - 0,25 ml le soir de sérum 25 pur.

Tableau 41
POUVOIR NEUTRALISANT DU SERUM N° 26
(Lapin anti-toxine R₂)

PROTOCOLE DE L'EXPERIENCE

Mélange correspondant au point 1 de la courbe de précipitation (fig. 20, page 56).

Toxine R ₂ - préparation "a" 8.110	5 mg
Sérum 26	10 ml
Tampon Borate M/50 + NaCl	30 ml
Eau physiologique	20 ml

Séjour 3^h à 45° - puis 3 jours à 0°.

Précipité recueilli par centrifugation et lavé à l'eau physiologique à 0°, puis remis en suspension en eau physiologique q.s.p. 2 ml et inoculé à la souris.

DOSE INOCULEE			RESULTATS
Suspension de précipité en ml.	Poids de toxine en ng ⁽¹⁾	Nombre de D M M correspondant	<u>Survies</u> Nombre total
0,1	0,25	2,5	4/4
0,2	0,50	5	2/4
0,4	1	10	0/2

(1) quantité de préparation toxique a contenue dans la dose de précipité spécifique inoculée, en supposant que toute la toxine utilisée est précipitée.

On pourrait penser aussi que ces sérums seraient, en réalité, dépourvus d'anticorps spécifiques contre le motif toxique et possèderaient seulement des anticorps contre les autres motifs antigéniques liés à la toxine. La protection partielle serait due à l'insolubilisation de la toxine provoquée par la précipitation de la molécule toxine - antigène.

Nous avons étudié de la même façon le pouvoir neutralisant du sérum de cheval anti toxine R2 N° 704. Nous avons préparé les précipités spécifiques correspondant aux points : B (zone excès d'anticorps), E - G (zone de chevauchement), J - L (zone excès d'antigène) de la courbe de précipitation quantitative (voir figure 21). Le tableau 42 donne le protocole et les résultats de cette expérience. Contrairement à ce qui se passe avec les sérums de lapins, les précipités obtenus en ces divers points de la courbe sont toujours atoxiques. S'il reste de la toxine non neutralisée, elle serait dans le surnageant (légère toxicité de celui-ci au point L).

TABLEAU 42
POUVOIR NEUTRALISANT DU SERUM 704
(cheval anti-toxine R₂)

PREPARATION DES MELANGES TOXINE-SERUM CORRESPONDANTS
A DIFFERENTS POINTS DE LA COURBE (fig. 21)
(Préparation toxique "a" 8.050)

Points de la courbe	Poids de toxine par 1 ml de sérum en mg.	Poids de toxine utilisé en mg (1)	Volume de NaCl 0,85 % q.s.p.	Volume de sérum en ml	Volume de tampon borate en ml	Excès de	
						Antigène	Anticorps
B	0,05	10	200	200	200	0	+
E	0,50	10	20	20	20	±	+
G	1,00	10	10	10	10	+	±
J	1,80	10	5,56	5,56	5,56	+	0
L	2,50	10	4	4	4	+	0

Séjour : 3 h à 45° - 3 jours à 0°

Précipités recueillis par centrifugation lavés trois fois à l'eau physiologique à 0°, puis remis en suspension en eau physiologique q.s.p. 4 ml et inoculé à la souris.

(1) Poids de préparation toxique "a".

Toxicité des Précipités et Surnageants
en différents points de la courbe

SOURIS SURVIVANTES / NOMBRE TOTAL INOCULE				
PRECIPITE			SURNAGEANT	Points de la courbe
0,1 ml (1) 0,25 mg (2) 1 D M (3)	0,2 ml (1) 0,50 mg 2 D M	0,5 ml 1,25 mg 5 D M	-	
4/4	6/6	4/4	-	B
4/4	6/6	4/4	-	E
4/4	6/6	4/4	-	G
4/4	6/6	4/4	9/10	J
4/4	6/6	3/4	7/10	L

(1) Volume de suspension de précipité inoculé.

(2) Quantité de préparation toxique "a" contenue dans la dose de précipité spécifique inoculé, en supposant que toute la toxine a été précipitée.

(3) Nombre de doses mortelles correspondant.

- IMMUNITÉ ACTIVE

L'étude des propriétés vaccinales de la toxine R2 a été effectuée sur des lots de souris blanches de 18 à 20 grammes.

Dans une première série, les souris ont reçu une seule injection d'une dose variable de préparation toxique "a" : 0,01 à 1 mg d'une préparation ("a" N° 8.003) dont la dose minima mortelle était de 1 mg (par voie intrapéritonéale). Les injections vaccinales étaient faites par voie intramusculaire. Les animaux éprouvés avec une dose minima mortelle, inoculée par voie intrapéritonéale, de toxine, au bout d'un mois ne présentaient aucune immunité.

Il en a été de même pour une deuxième série de souris immunisées par trois injections intramusculaires à huit jours d'intervalle avec 0,1 mg de préparation toxique "a" ("a" N° 8.032 DMM = 0,25 mg) additionnée d'alun de potassium (concentration finale 6 p. 1.000). Les animaux vaccinés moururent dans les mêmes délais que les témoins.

Devant ces résultats négatifs, nous avons cherché un adsorbant efficace de la toxine dans l'espoir que la toxine adsorbée serait antigéniquement plus active et pourrait être inoculée à dose plus élevée sans entraîner la mort. L'alun de Potassium à la concentration de 6 pour 1.000 et les gels d'alumine se sont montrés peu efficaces. Par contre, le phosphate d'alumine préparé selon HOLT (134) a donné de bons résultats. Nous employons environ 1 mg de phosphate d'alumine pour 1 mg de préparation "a" et nous laissons en contact pendant plusieurs heures, avant d'inoculer. L'adsorption de la toxine sur le phosphate d'alumine, en la rendant insoluble, diminue sa toxicité et permet d'injecter des doses de toxine qui seraient mortelles en solution aqueuse sans adjuvant.

Après adjonction de phosphate d'alumine et à condition de vacciner les animaux par un nombre relativement élevé d'injections (6 à 8 injections en 3 à 6 semaines), on obtient une bonne immunisation des souris qui résistent alors à l'inoculation d'une dose mortelle de toxine (préparation "a" en solution aqueuse). Nous avons vacciné plusieurs séries d'animaux par cette méthode. Il faut noter que ces injections répétées de toxine, même adsorbée, provoquent une forte mortalité en cours d'immunisation. Cela nous a obligée à modifier nos protocoles selon la toxicité des préparations de toxine "a" utilisées, parfois même à diminuer beaucoup les doses et à multiplier les injections.

L'adjonction à la toxine du mélange de FREUND (98 à 100) permet également une bonne vaccination à condition de faire un nombre suffisant d'injections. Une première série avec trois injections seulement, de 0,25, 0,50 et 1 mg de préparation "a" (N° 8.003 DMM = 1 mg) témoignait d'une immunité certaine, mais insuffisante. Après six injections, correspondant à une dose totale de 4 mg de préparation toxique "a", la protection était satisfaisante (tableau 43).

Un essai d'immunisation par la préparation "a" partiellement détoxifiée par acétylation (action de l'anhydride acétique sur la toxine en solution dans la pyridine) a été complètement négatif, malgré un grand nombre d'injections vaccinales.

Par contre, une expérience d'immunisation avec la préparation "a" partiellement détoxifiée par un séjour d'un mois à 37° après ajustement de la solution à pH = 8,4 et addition de formol à 5 pour 1.000, a donné de bons résultats. La mortalité en cours d'immunisation est relativement faible (3/10) par rapport aux autres séries et la protection obtenue est presque totale (6/7).

Le tableau 43 permet de comparer ces différents modes d'immunisation et leurs résultats.

Les souris vaccinées avec adjuvants (soit phosphate d'alumine, soit mélange de Freund) par la préparation toxique "a" ont été éprouvées par une dose minima mortelle, préalablement déterminée, de suspensions de germes tués par chauffage à 60° pendant une heure. Les bactéries suivantes ont été utilisées pour ces épreuves : *S. typhi* R2, *S. typhi* Ty 2, (0 + VI), *S. paratyphi* A rough (souche A 104), *S. paratyphi* B smooth (souche Bjs), *S. enteritidis* Danysz (0 IX).

Les résultats de ces épreuves sont résumés dans le tableau 44.

Un lot de souris immunisées et éprouvées par la toxine R2 a été inoculé avec une dose minima infectante, préalablement déterminée (environ 100 bactéries vivantes) de *S. enteritidis* Danysz, germe naturellement très pathogène pour la souris. Les animaux immunisés ont succombé à l'infection à peu près dans les mêmes proportions et les mêmes délais que les animaux témoins (tableau 45).

Quelques souris, immunisées par la toxine R2 (préparation "a" formolée), ont été éprouvées par une solution d'antigène 0 préparé par extraction trichloracétique de la souche 0 901. La protection a été totale : chez les souris vaccinées 6 souris survivantes sur 6 inoculées, chez les témoins, 0 survivante sur 6 inoculées.

Enfin, un lot de souris immunisées et éprouvées par la toxine R2 a été inoculé avec une dose minima mortelle de toxine extraite de *Shigella Shigae* rough. L'évolution a été nettement retardée, chez les animaux vaccinés (7 jours après l'injection, 8 souris survivantes sur 10 inoculées chez les vaccinées, 0 survivante sur 10 inoculées chez les témoins) et une propor-

Tableau 43

IMMUNISATION ET EPREUVE DES SOURIS

par la Toxine R₂

N° de série	Mode d'immunisation	Dose totale de toxine en mg. (2)	NOMBRE DE SOURIS		EPREUVE (1)	
			Début	Fin	Vaccinées	Témoins
1	Toxine seule 1 injection	0,01 à 1,0	40	9	0/9	0/8
2	Alun de K 3 injections	0,30	100	60	2/60	4/30
3	Freund 3 injections	1,75	25	20	12/20	1/20
4	Freund 6 injections	4,0	25	20	18/20	0/10
5	PO ^H A1 6 injections	5,0	50	26	18/20	0/15
6	PO ^H A1 8 injections	6,5	50	22	10/10	0/10
7	PO ^H A1 6 injections	3,5	150	31	13/15	0/10
8	PO ^H A1 12 injections	2,5	50	14	11/14	0/10
9	a acétylée 14 injections	6,0	10	5	0/5	0/5
10	a formolée (pH = 8,4) 6 injections	6,0	10	7	6/7	0/10

(1) Le numérateur indique le nombre de souris survivantes.
Le dénominateur, le nombre de souris inoculées.

(2) Quantité totale de préparation toxique "a" inoculée.

Tableau 44
IMMUNITÉ ANTI-TOXIQUE
souris immunisées avec la Toxine R₂
éprouvées par des suspensions de germes tués

Germes utilisés pour l'épreuve	Doses ⁽¹⁾	SURVIES / TOTAL INOCULÉ	
		Vaccinées	Témoins
S. typhi R ₂	15 × 10 ⁹	5/8	0/8
S. typhi Ty ₂	15 × 10 ⁹	7/10	0/10
S. paratyphi B. smooth	12 × 10 ⁹	3/10	0/10
- d° -	6 × 10 ⁹	8/10	2/10
S. paratyphi A rough	20 × 10 ⁹	2/8	1/8
- d° -	10 × 10 ⁹	8/8	1/8
S. entéritidis Danysz	12 × 10 ⁹	9/10	0/10

(1) Nombre de germes déterminé par mesure de la densité optique des suspensions au photomètre.

Tableau 45
RECHERCHE DE L'IMMUNITÉ ANTI-INFECTIEUSE
souris immunisées avec la toxine R₂
éprouvées par inoculation de germes vivants
(*Salmonella Entéritidis Danysz*)

Délais d'observation	SURVIES / TOTAL INOCULÉ	
	Vaccinées	Témoins
5 jours	9/10	7/10
8 jours	7/10	6/10
12 jours	3/10	3/10
15 jours	2/10	0/10
20 jours	1/10	

Pas d'immunité anti-infectieuse après immunisation par la toxine R₂.

tion notable (4/10) a survécu définitivement. Différents auteurs avaient déjà obtenu une très faible immunité croisée entre les endotoxines extraites de différentes entérobactériacées en forme smooth : *S. typhi*, *S. paratyphi B*, *Sh. Shigae* (MORGAN H.R. 191) ou même de différentes espèces de bactéries gram négatives (ZAHLE & HUTNER 309).

L'ensemble de ces résultats permet de tirer les conclusions suivantes :

- 1 - La vaccination par injections répétées de toxine R2 confère une immunité antitoxique certaine. Cependant cette immunité antitoxique est malgré tout assez faible ; dès qu'on inocule lors de l'épreuve des doses trop fortes de toxine ou de germes tués, la protection diminue jusqu'à disparaître presque complètement (voir le tableau 44).
- 2 - Cette immunité antitoxique protège contre les endotoxines de diverses Salmonelles smooth contenant des antigènes somatiques immunologiquement très différents.
- 3 - Par contre, la vaccination par injections répétées de toxine R2 ne confère pas d'immunité anti-infectieuse, au moins dans les conditions de notre expérience.

Divers auteurs ont déjà montré que les formes rough peuvent protéger l'animal contre l'action toxique ou même l'infection causées par les formes smooth. Citons MALTANER avec *S. typhi* (178), BOROFF avec *Shigella Shigae* (55), KROGER avec *S. Dublin*, *S. paratyphi B* et *S. enteritidis* (158 - 159). Mais ils ont utilisé comme vaccins des germes tués et non un antigène soluble et la protection n'a été constatée que pour des bactéries de même espèce.

On peut penser que l'immunité anti-infectieuse et l'immunité antitoxique sont indépendantes chez les Salmonelles. On sait déjà qu'il en est ainsi dans le cas du bacille pesteux, comme SCHUTZE (254) l'avait montré dès 1934 et comme le fait a été largement vérifié depuis par les travaux de MEYER et coll. (8 - 9 - 67 - 68), ENGLESBERG (87), LANDY (166), NEEL (205). Le bacille pesteux possède un antigène d'enveloppe de nature protéique (CHEN & MEYER 68), complètement distinct de la toxine. Seuls les anticorps anti-antigène d'enveloppe assurent une protection contre l'infection, tout en étant complètement dépourvus de pouvoir neutralisant vis-à-vis de la toxine. Une souche dépourvue d'antigène d'enveloppe ne possède aucun pouvoir vaccinant. On sait que dans le cas des Salmonelles, l'antigène O et surtout l'antigène Vi doivent être présents dans une souche pour que celle-ci possède un pouvoir vaccinant efficace. (Cf. ARKWRIGHT 5 et 6, GRINNEL 124 et 126, GREENWOOD 123, PERRY 220 et 221, HALE 129, KAUFFMANN 153, HENDERSON 132, BOIVIN 38 et 49).

Les antigènes rough semblent jouer un rôle peu important dans le pouvoir vaccinant antimicrobien : les vaccins tués à base de bactéries en forme rough ne possèdent qu'une activité faible dans la prévention de l'infection.

A ce sujet, notons que sur le plan expérimental, il est très difficile d'assimiler l'épreuve sur la souris par des suspensions de bactéries vivantes de *S. typhi* à une épreuve de résistance anti-infectieuse ; en effet, pour tuer la souris, il faut injecter des doses de l'ordre de 500 millions de bactéries et les témoins meurent en 24 à 48 heures. Il s'agit plus d'une épreuve de toxicité, comportant peut-être quelques divisions bactériennes, que d'une épreuve d'infection. Par contre, si l'on s'adresse à une bactérie virulente pour la souris, *S. Aertrycke* ou *S. enteritidis Danysz*, on obtient une véritable infection avec une évolution de 6 à 15 jours ; la dose minima infectante est comprise entre 1 et 100 bactéries, ce qui est loin des 500 millions nécessaires avec *S. typhi*.

On sait qu'en général, les formes rough ne protègent pas contre l'infection et nous avons pu nous-même constater que les antigènes extraits de *S. typhi R2* en forme rough, qui présentent un pouvoir immunisant vis-à-vis de la toxine (épreuve par une ou deux doses minima mortelles) et protègent contre l'injection d'une dose mortelle de suspension de bactéries tuées de *S. enteritidis Danysz* (survie 90%, voir tableau 44), ne donnent aucune protection contre ces bactéries vivantes. La bactérie smooth virulente a donc pu se développer malgré l'existence d'anticorps anti-endotoxine R2, qui sont pourtant capables de neutraliser l'effet toxique d'une suspension tuée de ces mêmes bactéries. Il est probable que l'immunité antitoxique, conférée par l'immunisation avec l'endotoxine R2, ne provoque qu'un taux d'anticorps antitoxiques insuffisant pour lutter contre l'intoxication massive liée au développement d'une grande quantité de bactéries *S. enteritidis Danysz* à la suite de l'infection. Cette expérience démontre, en tout cas, que ces anticorps sont sans action sur la multiplication de quelques bactéries virulentes (10 à 100).

Il est probable que les mécanismes mis en jeu pour la défense antimicrobienne sont très différents de ceux qui interviennent dans la neutralisation de la toxine par les anticorps anti-toxiques. BOIVIN (50 - 51) a déjà montré le rôle prépondérant de la phagocytose dans la lutte contre l'infection.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

En terminant l'exposé de ce travail, nous croyons pouvoir en tirer les conclusions suivantes :

1°) - On peut extraire des bactéries en forme rough du bacille typhique une toxine, que nous appelons toxine R2. Les préparations toxiques que nous avons obtenues à partir de ces germes sont poid pour poid aussi toxiques que les préparations d'endotoxine extraites des formes smooth.

2°) - Les préparations de toxine R2 sont, comme les endotoxines extraites des formes smooth par les différents auteurs, des complexes protéine - polyside - lipide. Ce complexe toxique a été purifié, mais nous n'avons pas réussi à déterminer la nature chimique réelle du constituant toxique. Les fractions toxiques isolées sont toujours complexes et lorsque nous avons scindé le complexe, nous avons jusqu'à maintenant perdu la toxicité.

3°) - La toxine R2 est indépendante des éléments spécifiques O et Vi du bacille typhique.

En effet, les préparations de toxine R2 ne sont pas précipitées par les sérums riches en anticorps O et Vi. Réciproquement les sérums préparés avec nos différentes préparations de toxine R2 ne précipitent pas les antigènes O et Vi et n'agglutinent pas les bactéries O et Vi.

4°) - La toxine R2 semble étroitement associée aux antigènes rough.

En effet, les sérums riches en anticorps rough précipitent nos préparations toxiques. Réciproquement les sérums obtenus avec nos différentes préparations de toxine R2 précipitent les antigènes extraits de diverses bactéries rough et agglutinent fortement toutes les Salmonelles en forme rough étudiées.

5°) - La toxine R2 permet d'obtenir une immunité antitoxique chez l'animal, qui résiste alors aux endotoxines de diverses Salmonelles de constitutions antigéniques très différentes, aussi bien à l'endotoxine O des souches smooth qu'à la toxine R2 des souches rough.

ESSAI D'INTERPRETATION

Quelle place prend la toxine R2 dans l'état actuel de nos connaissances sur la toxine typhoïdique ?

Deux hypothèses peuvent être formulées :

- PREMIERE HYPOTHESE : THEORIE PLURALISTE

Il existerait plusieurs endotoxines typhoïdiques, au moins deux :

1) - l'endotoxine O, associée à l'antigène somatique O, a été, nous l'avons vu au cours de l'exposé historique, préparée et étudiée par de nombreux auteurs.

2) - Nous pensons, à l'issue de ce travail, avoir établi l'existence de la toxine R2 associée à l'antigène rough.

3) - Faut-il parler aussi d'une endotoxine Vi ? La question est discutée. LANDY, WEBSTER & FREEMAN (165 et 284) ont montré que la toxine extraite des bactéries *S. typhi* Ty2 (O + Vi) est en réalité de l'endotoxine O ; après élimination de cette dernière, ils obtiennent un antigène Vi très purifié, qui n'est pas toxique. Il semblerait donc que la toxicité des souches Vi serait due aux autres antigènes associés au Vi. Chez les souches Vi smooth (Vi + O) la toxicité devrait être attribuée à l'antigène O ; chez les souches demi rough (Vi + R), la toxicité pourrait être due seulement à la toxine R2 associée à l'antigène rough.

Les toxines O et R2 ainsi distinguées sont-elles absolument différentes ? Nous en examinerons les points communs et les dissemblances.

Caractères communs et différentiels des toxines O et R2.

a) Composition chimique.

Du point de vue chimique, les toxines O et R2 sont toutes deux des complexes contenant protéine (ou peptide), polyside, lipide. Si nos préparations de toxine R2 contiennent plus d'azote que les préparations de toxine O obtenues par d'autres auteurs, nous pensons que ce caractère n'est que secondaire et tient à notre technique d'extraction ; la teneur en azote dépend beaucoup de la méthode utilisée pour la préparation. Du reste, nos préparations de toxine O extraites par la solution hypertonique NaCl - Citrate avaient des taux d'azote du même ordre de grandeur que nos préparations de toxine R2.

La différence chimique essentielle entre ces toxines réside dans le polyside. Les polysides des toxines O et R2 semblent bien être distincts. Le polyside O contient glucose, galactose, mannose, rhamnose et un sucre appelé "tyvelose" par Westphal, comme l'ont établi PON & STAUB (225, 226) ; WESTPHAL & LUDERITZ (173 - 293 à 295), YOKOYAMA (307), FREEMAN (97). Nous n'avons trouvé que glucose et galactose dans notre préparation de toxine R2-a ; ceci est en accord avec la composition donnée par WESTPHAL (295) pour le polyside rough.

b) Action physiologique.

Les deux toxines O et R2 inoculées à l'animal ont un certain nombre d'effets communs. Toutes deux provoquent dyspnée, hyperthermie aux doses faibles, hypothermie aux doses fortes, hyperglycémie, leucopénie avec mononucléose. Ces différents symptômes accompagnent de profonds troubles nerveux et intestinaux. Ici, le tableau d'intoxication par les deux toxines se différencie le plus souvent. Les symptômes intestinaux (diarrhée) et les lésions constatées à l'autopsie sont toujours nettement plus accusés avec la toxine O qu'avec la toxine R2. Ils peuvent même faire totalement défaut avec cette dernière, cependant nous avons vu qu'inoculée dans les ganglions mésentériques du cobaye, la toxine R2 détermine très souvent des lésions intestinales. Au contraire, les symptômes nerveux observés après inoculation intraveineuse sont généralement plus nets avec la toxine R2 qu'avec la toxine O : les animaux sont dans un état de prostration plus profonde, la catatonie est plus accusée ; nous avons signalé que par inoculation d'antigène O dans les ventricules, TARDIEU (263) a obtenu un tufos typique. Il n'est pas exclu toutefois que la toxine O préparée selon Boivin contienne une faible quantité de toxine R2 qui soit l'élément actif lors de l'injection intraventriculaire. La présence d'antigène R2 dans les préparations de type Boivin a été mise en évidence par nos expériences de précipitation spécifique en gel.

c) Activité sérologique.

Dans ce domaine, la distinction est absolument totale. Tandis que toutes les caractéristiques sérologiques de la toxine O se confondent avec celles de l'antigène somatique O, la toxine R2 se montre étroitement associée à l'antigène somatique rough.

d) Pouvoir vaccinant

Les deux toxines O et R sont douées de pouvoir vaccinant et provoquent par injections répétées à l'animal la formation d'anticorps antitoxiques qui le protègent contre une inoculation mortelle de toxine. Cette protection est toujours faible, aussi bien pour la toxine O (BOIVIN 37 - 40) que pour la toxine R2 et ne s'étend jamais qu'à un petit nombre de doses mortelles, à l'inverse des toxines telles que toxine diphtérique, tétanique ou botulinique.

BOIVIN a indiqué que la protection conférée par la vaccination au moyen de la toxine O est spécifique, c'est-à-dire qu'elle ne s'applique qu'à l'endotoxine extraite du même germe ou d'un germe possédant la même constitution antigénique (37 et 40). Si on observe parfois une protection croisée entre endotoxines de germes différents, celle-ci est toujours minime.

Nous avons constaté, au contraire, que notre toxine R2, utilisée comme vaccin, protège non seulement contre l'action toxique des bactéries *S. typhi* R2, ou d'autres Salmonelles en forme rough, mais encore contre l'intoxication par les bactéries smooth de constitutions antigéniques très différentes, ou par la toxine O extraite selon la technique de Boivin.

La comparaison de ces différents caractères des toxines O et R2 montre que si celles-ci présentent des différences, elles ont pourtant un bon nombre de points communs importants. Cette constatation justifie, pensons-nous, une deuxième hypothèse.

- DEUXIEME HYPOTHESE : THEORIE UNICISTE.

A des antigènes distincts par leurs polysides, responsables des différences chimiques et sérologiques, serait associé un élément toxique unique.

Pour la toxine O, comme pour la toxine R2, au polyside sont liés une protéine, (ou un peptide), et un lipide. Ces trois éléments forment un complexe, soit que ce complexe existe naturellement dans le corps de la bactérie, soit qu'il soit formé artificiellement par les procédés d'extraction et de purification des toxines. Les toxines O et R2 pourraient être schématisées de la manière suivante :

$$\begin{aligned}\text{toxine O} &= P(O) - G(O) - L(O) - T \\ \text{toxine R2} &= P(R) - G(R) - L(R) - T\end{aligned}$$

où P représente une protéine ou un peptide, G le polyside, L le lipide et T la copule toxique. Les polysides O et R des formes smooth et rough sont différents : peut-être en est-il de même pour le constituant protidique et pour le lipide, cette question n'a pas été étudiée ; au contraire, la copule toxique serait la même pour les deux formes.

Quelle est la nature chimique de cette copule toxique ?

Différentes expériences de clivage montrent la toxicité associée tantôt à l'un, tantôt à l'autre de ces constituants du complexe.

Par hydrolyse acétique ou picrique ménagée du complexe, la toxicité reste liée à un constituant protidique (MORGAN (196 - 198), GOEBEL (17 - 111)).

En traitant le complexe soit par le phénol à 90 %, soit par une solution alcaline, MORGAN (197) a obtenu une dissociation qui permettait d'isoler un polyside toxique.

Ces résultats ont été confirmés, en particulier par FREEMAN (97) et GOEBEL (17).

Différents auteurs étudiant le pouvoir pyrogène du complexe (73 - 108 - 244 - 184) ont également trouvé le pouvoir pyrogène et le pouvoir toxique, qu'ils identifient en général, associé à un polyside. Cependant IKAWA, NIEMAN & coll. (140 à 143) étudiant le complexe extrait de *Escherichia Coli*, qui présente des propriétés assez voisines de celui extrait de *S. typhi*, ont montré qu'il s'agit en réalité non d'un polyside pur, mais d'un complexe lipide-polyside, d'un "lipopolysaccharide". En le dissociant par hydrolyse acide forte et en l'analysant, ils ont identifié parmi les composants de la partie lipidique : la D glucosamine, l'éthanolamine, une diamine qu'ils nomment la nécrosamine, l'acide aspartique, l'acide phosphorique et différents acides gras : acide laurique, acide myristique, acide D β hydroxymyristique, acide palmitique.

WESTPHAL & LUDERITZ (295) ont également isolé un "lipopolysaccharide" et ils ont trouvé le pouvoir pyrogène lié au constituant lipidique. Ils ont en effet réussi à isoler un lipide, contenant également hexosamine, éthanolamine, etc... qu'ils appellent le "lipide A". Ce lipide A peu actif seul, est aussi actif que le complexe original si on le couple avec une protéine étrangère (caséine). Cependant, il convient de noter que le "lipide A" contient des acides aminés ; ce serait donc en réalité un lipidopeptide.

Est-il possible d'obtenir de la même façon un lipide toxique à partir de notre toxine R2 ? La fraction lipidique que nous avons isolée est pyrogène, mais dépourvue, au moins dans nos conditions d'expérience, de pouvoir létal.

Quelqu'il en soit, si les données chimiques actuelles ne nous permettent pas d'identifier les toxines O et R2, les expériences de protection croisée après vaccination par la toxine R2, nous paraissent un fort argument en faveur de l'unicité du principe toxique, lié à des antigènes distincts chez les formes smooth et rough (antigènes O et R) et différents selon les espèces en forme smooth (différents facteurs antigéniques de l'antigène O - Cf. tableau de WHITE - KAUFFMANN).

A la question posée au début de cette étude : "La toxine des formes rough est-elle la même que celle des formes smooth, liée à des antigènes différents ?," nous pensons donc qu'on peut répondre qu'il y a de fortes probabilités pour qu'il en soit ainsi. Et cette toxine serait probablement la même pour un grand nombre, sinon pour toutes les Salmonelles.

Cependant cette conclusion n'exclut pas la possibilité de l'existence d'une autre toxine typhoïdique (toxine thermolabile de Vincent), qui se trouverait seulement chez certaines souches bactériennes fraîchement isolées du malade.

Il se pourrait aussi que la toxine typhoïdique soit unique et qu'elle puisse exister :

- soit à l'état libre, sous forme d'une très petite molécule : dans ce cas elle pénétrerait facilement dans l'organisme jusqu'aux centres nerveux, d'où les accidents nerveux prépondérants ; mais elle serait par contre très labile (destruction rapide dans les filtrats, thermolabilité, disparition de cette forme chez les souches cultivées en laboratoire qui deviendraient inaptes à la produire (toxine de Vincent)).

- soit liée à des complexes antigéniques différents et cette solide liaison avec des grosses molécules lui conférerait une grande stabilité (thermorésistance en particulier), tout en réduisant ses facilités de pénétration dans l'organisme ; elle atteindrait moins facilement les centres nerveux et se fixerait plutôt localement sur les formations du système neurovégétatif, d'où la prédominance des lésions intestinales avec la toxine O que Reilly a bien montré être sous la dépendance du système neuro-végétatif.

La toxine R2 pourrait représenter un état de complexité intermédiaire entre ces deux formes extrêmes.

RESUME

Le problème de la toxine typhoïdique, bien qu'étudié depuis fort longtemps, reste obscur. On a identifié l'endotoxine du bacille typhique avec les antigènes somatiques spécifiques des formes smooth de ces germes et on a admis, de façon très générale, que les formes rough de ces germes, dépourvues de ces antigènes somatiques spécifiques et avirulentes, étaient non pathogènes et non toxiques.

D'autre part, VINCENT a affirmé l'existence d'une toxine typhoïdique différente de cette endotoxine classiquement connue, (neurotoxine de Vincent). Il existerait donc plusieurs toxines typhoïdiques.

Nous appuyant sur quelques observations, notées incidemment par quelques auteurs (toxicité de certains germes rough), nous avons recherché si une deuxième toxine se trouverait chez les formes rough du bacille typhique.

Nous avons montré, au cours de ce travail, que contrairement aux données classiques, on peut extraire des formes rough du bacille typhique un antigène non spécifique qui est poids pour poids aussi toxique que l'antigène somatique spécifique O des formes smooth. Nous avons fait l'étude de cette nouvelle toxine et nous avons examiné ses rapports avec l'endotoxine classique O du bacille typhique.

PREPARATION

La toxine a été extraite des bactéries par une solution hypertonique de chlorure de sodium et de citrate de sodium. Différentes méthodes ont été mises en oeuvre pour concentrer et purifier la substance toxique que nous appelons toxine R2.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le produit obtenu après lyophilisation se présente sous la forme d'une poudre blanche, amorphe, soluble dans l'eau. Il est homogène à l'électrophorèse, mais non à l'ultra-centrifugation.

Il contient de l'azote (taux moyen 7,5 %) du phosphore (0,5 à 2 %), des glucides (taux moyen de sucres réducteurs après hydrolyse 16 %), des lipides (10 à 14 %). Il s'agit d'un complexe protéine (ou peptide) - polyside - lipide, analogue aux endotoxines typhoïdiques préparées par les différents auteurs à partir de formes smooth. Le polyside se montre différent du polyside de l'endotoxine-antigène O : tandis que ce dernier renferme glucose, galactose, mannose, rhamnose, tyvelose, nous n'avons identifié que glucose et galactose dans celui de nos préparations de toxine R2. Ce résultat est en accord avec les analyses du polyside des formes rough des Salmonelles faites par WESTPHAL et LUDERITZ. Comme ces auteurs, nous avons trouvé la présence d'éthanolamine et l'absence de choline dans la fraction lipidique de notre complexe.

PROPRIETES BIOLOGIQUES ET IMMUNOLOGIQUES

- I - Toxicité -

Les préparations de toxine R2 tuent la souris à la dose de 100 microgrammes par injection intrapéritonéale, le lapin à des doses variant de 20 à 50 microgrammes par kilogramme en injection intraveineuse. La toxine R2 reproduit, chez la souris, dans certaines conditions, tous les symptômes de la salmonellose. Elle détermine chez le lapin des accidents nerveux (sommolence, prostration, catatonie), des troubles circulatoires (vaso-constriction des vaisseaux périphériques, et de façon moins régulière des accidents intestinaux (diarrhée). Elle a, chez ce même animal, une action hyperthermisante aux doses faibles, hypothermisante aux doses fortes, hyperglycémiant, leucopénisant avec lymphocytose (disparition presque totale des polynucléaires du sang circulant).

Cette toxine est relativement très stable : elle résiste au chauffage à 100° ; la toxicité n'est qu'atténuée par un chauffage prolongé (2 h. 1/2). Elle n'est pas détoxifiée, par action du formol et de l'iode, ni par acétylation.

- 2 - Propriétés antigéniques -

Les préparations de toxine R2 sont antigéniques chez le lapin et le cheval. Par inoculations répétées à ces animaux, elles déterminent la formation d'agglutinines, de précipitines et d'anticorps fixant le complément. L'étude des sérums de lapins et de chevaux obtenus avec les diverses préparations de toxine R2 et avec des suspensions de germes de différentes Salmonelles, au moyen des réactions d'agglutination, de précipitation et de fixation du complément, montre que les préparations obtenues sont complexes. Elles contiennent l'antigène flagellaire H(d) et des antigènes rough, mais pas d'antigène O, ni d'antigène Vi. Des préparations toxiques privées d'antigène flagellaire, obtenues par digestions au moyen de préparations brutes de trypsine et de phosphatase ont prouvé que la toxicité est indépendante de l'antigène flagellaire. Les antigènes rough présents dans les préparations de toxine R2 sont communs à de nombreuses Salmonelles de différentes espèces. Les réactions de précipitation spécifique en gel ont montré que ces préparations contiennent des antigènes rough, également présents dans l'endotoxine O préparée selon la technique de Boivin, et un ou plusieurs antigènes communs avec les préparations toxiques extraites de *Sh. Shigae* en forme rough. La toxine R2 est donc indépendante des antigènes spécifiques H, O et Vi du bacille typhique, mais elle semble associée aux antigènes rough.

- 3 - Propriétés vaccinales -

La toxine R2 est vaccinante. Inoculée à faibles doses répétées, elle provoque chez le cheval la formation d'anticorps antitoxiques, qui confèrent au sérum un pouvoir neutralisant capable de protéger la souris contre l'injection d'une dose mortelle de toxine. Utilisée comme vaccin chez la souris, à condition de faire un nombre suffisant d'injections vaccinales, (soit avec la toxine additionnée d'adjuvants : phosphate d'alumine, mélange de Freund, soit avec une solution de toxine atténuée), elle confère à cet animal un état d'immunité lui permettant de résister à une inoculation mortelle de toxine, ou à l'intoxication par une suspension de germes tués. Cette immunité le protège non seulement contre l'endotoxine des bactéries R2 et d'autres Salmonelles en forme rough, mais encore contre l'endotoxine O préparée selon Boivin et contre l'intoxication par les germes tués de différentes Salmonelles en forme smooth de constitutions antigéniques différentes.

Par contre, nous n'avons obtenu aucune immunité anti-infectieuse par vaccination avec la toxine R2. Inoculées avec un petit nombre (50 à 100) de bactéries vivantes virulentes de *S. enteritidis* Danysz, (souche smooth), germe naturellement très pathogène pour la souris, les souris vaccinées sont mortes à peu près dans les mêmes proportions et les mêmes délais que les témoins. Ce résultat est en accord avec les données classiques attribuant aux antigènes rough un faible rôle dans le pouvoir vaccinant antimicrobien. L'immunité antitoxique et l'immunité antimicrobienne mettent probablement en jeu des mécanismes différents. La mise en évidence d'une protection antitoxique croisée entre la toxine R2 et les endotoxines O de différentes espèces de Salmonelles permet de penser que le principe toxique de ces différentes Salmonelles serait probablement semblable.

CONCLUSIONS

Il existe donc une toxine typhoïdique "toxine R2" indépendante des éléments spécifiques O et Vi du bacille typhique. On peut penser que l'endotoxine classique ou antigène O et la toxine R2 constituent des toxines différentes. Cependant la toxine R2, associée à l'antigène rough, bien que distincte sérologiquement de l'endotoxine classique O, présente avec celle-ci de nombreux points communs. Les expériences de vaccination et de protection croisée permettent de supposer qu'il s'agit d'un principe toxique unique lié à des antigènes différents entre eux chimiquement et sérologiquement selon la forme (smooth ou rough) et selon l'espèce de la bactérie. Les formes smooth et rough des différentes Salmonelles contiendraient donc une même toxine.

* * * * *
* * *
*

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AOKI K. - Immunizatorische Studien über die toxisch wirkenden Rezeptoren von Typhus - und Mäusetyphus-bazillen.
Z. Immunitätsf. 1939 - **95** - 112.
- 2 - ARIMA R. - Ueber die Typhustoxine und ihre pathogene Wirkung.
Zbl. Bakt. I Orig. 1912 - **63** - 424.
- 3 - ARKWRIGHT J.A. - Variations in bacteria in relation to agglutination by salts and by specific sera.
J. Path. Bact. 1920 - **23** - 358.
- 4 - ARKWRIGHT J.A. - Variations in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific sera.
J. Path. Bact. 1921 - **24** - 36.
- 5 - ARKWRIGHT J.A. - A note on the different immunizing value of vaccine made with smooth and rough forms of bacteria.
J. Path. Bact. 1926 - **29** - 318.
- 6 - ARKWRIGHT J.A. - The value of different kinds of antigen in prophylactic enteric vaccines.
J. Path. Bact. 1927 - **30** - 345.
- 7 - BAHR L. et DYSSEGARD A. - Die Endotoxine der Paratyphus - Enteritis - Bakterien.
Zbl. Bakt. I Orig. 1927 - **102** - 268.
- 8 - BAKER E.E., SOMMER H., FOSTER L.E., MEYER E. et MEYER K.F. - Antigenic structure of Pasteurella pestis and the isolation of a crystalline antigen.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1947 - **64** - 139.
- 9 - BAKER E.E., SOMMER H., FOSTER L.E., MEYER E. et MEYER K.F. - Studies on immunization against plague.
I - The isolation and characterization of the soluble antigen of P. Pestis. J. Immun. 1952 - **68** - 131.
- 10 - BALTHAZARD - Toxine et antitoxine typhiques.
Thèse Médecine-Paris 1903.
- 11 - BASSENGE et MAYER - Zur Toxingewinnung aus gefrorenen Typhusbazillen.
Zbl. Bakt. I Orig. 1904 - **36** - 332.
- 12 - BEGUIN S. - Etude sur les formes rugueuses des Salmonelles.
Thèse Pharmacie - Bordeaux 1952.
- 13 - BEGUIN S. et GRABAR J. - Etude sur les formes rugueuses des Salmonelles.
Ann. Inst. Pasteur 1953 - **84** - 723.
- 14 - BESREDKA - Etudes sur le bacille typhique et le bacille de la peste.
Ann. Inst. Pasteur 1905 - **19** - 477.

- 14 - BESREDKA - Etudes sur le bacille typhique et le bacille de la peste.
Ann. Inst. Pasteur 1905 - **19** - 477.
- 15 - BESREDKA - Des endotoxines solubles (typhique, pesteuse, dysentérique).
Ann. Inst. Pasteur 1906 - **20** - 304.
- 16 - BEUMER et PEIPER - Bactériologische Studien über die ätiologische Bedeutung der Typhus-bazillen.
Z. f. Hyg. Infekt. 1886 - **1** - 489.
1887 - **2** - 110.
- 17 - BINKLEY F., GOEBEL W.F. et PERLMAN E. - Studies on the Flexner group of dysentery bacilli.
II - The chemical degradation of the specific antigen of Type Z Shigella paradysenteriae (Flexner).
J. Exp. Med. 1945 - **81** - 331.
- 17a - BIZZINI B., DIGEON M. et RAYNAUD M. - Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique.
III - Préparation d'une toxine soluble -
Ann. Inst. Pasteur 1954 - **87** - 724.
- 18 - BLASS J., LECOMTE O. POLONOWSKI J. - Sur une technique d'électrophorèse associée à la chromatographie sur papier. Chromatophorèse appliquée aux aminoacides et bases aminées -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 - **36** - 627.
- 19 - BOCQUET P., BOVET et LEHOULT Y. - Etude de la réaction vasculaire au cours de l'infection typhique expérimentale -
C.r. Ac. Sc. 1946 - **224** - 1671.
- 20 - BOCQUET P., DELAUNAY A., LEHOULT Y. et LEBRUN J. - Observation directe des réactions vasculaires cutanées chez le lapin soumis à l'épreuve d'une endotoxine typhique.
C. r. Ac. Sc. 1947 - **225** - 1193.
- 21 - BOCQUET P., DELAUNAY A., LEHOULT Y. et LEBRUN J. - Action d'un antigène typhique purifié sur le système circulatoire périphérique du lapin -
Ann. Inst. Pasteur 1948 - **74** - 136.
- 22 - BOCQUET P. et LEHOULT Y. - Action vasomotrice d'un extrait de bacilles typhiques.
C.r. Soc. Biol. 1948 - **142** - 165.
- 23 - BOCQUET P. et IZARD Y. - Recherches sur l'hyperglycémie expérimentale par l'endotoxine typhique -
C.r. Soc. Biol. 1951 - **145** - 851.
- 24 - BOIVIN A., MESROBEANU I. et MESROBEANU L. - Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques.
C.r. Soc. Biol. 1933 - **113** - 490.
- 25 - BOIVIN A., MESROBEANU I. et MESROBEANU L. - Extraction d'un complexe toxique et antigénique à partir du bacille d'Aertrycke -
C.r. Soc. Biol. 1933 - **114** - 307.
- 26 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Sur les propriétés chimiques d'une substance toxique et immunisante isolée du bacille d'Aertrycke.
C.r. Ac.Sc. 1934 - **198** - 2.211.
- 27 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Sur l'action hyperglycémiant du complexe toxique, spécifique et antigénique isolé à partir du bacille d'Aertrycke.
C.r. Soc. Biol. 1934 - **117** - 273.
- 28 - BOIVIN A. MESROBEANU L. et MESROBEANU I. - Sur la teneur du bacille d'Aertrycke en substance polysaccharidique spécifique et antigénique.
C.r. Soc. Biol. 1934 - **117** - 271.

- 29 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries.
I - Considérations générales et exposé des techniques utilisées.
Rev. Immunol. 1935 - **1** - 553.
- 30 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Sur les substances spécifiques renfermées dans le bacille d'Aertrycke et dans le bacille de Gærtner. Antigènes complets et antigènes résiduels.
C.r. Soc. Biol. 1935 - **118** - 612.
- 31 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - L'antigène complet constituant acido-soluble de l'endotoxine renfermée dans les formes S du bacille d'Aertrycke et du Bacille de Gærtner.
C.r. Soc. Biol. 1935 - **118** - 614.
- 32 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries.
II - L'antigène somatique complet (antigène O) de certaines bactéries est le constituant principal de leur endotoxine.
Rev. Immunol. 1936 - **2** - 113.
- 33 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries.
III - Antigène somatique O et variations bactériennes.
Rev. Immunol. 1937 - **3** - 319.
- 34 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Sur la nature et les propriétés biologiques des toxines produites par le bacille de Shiga et par le bacille de Flexner.
C.r. Ac. Sc. 1937 - **204** - 302.
- 35 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les toxines dysentériques. Sur l'identité entre la toxine thermolabile et neurotrope des corps bactériens du bacille de Shiga et l'exotoxine présente dans les filtrats de culture sur bouillon de la même bactérie.
C.r. Soc. Biol. 1937 - **126** - 323.
- 36 - BOIVIN A. et MESROBEANU - Sur la nature chimique et sur les propriétés biologique de l'antigène Vi du bacille typhique.
C.r. Ac. Sc. 1938 - **206** - 1.416.
- 37 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries.
IV - Sur l'action antiendotoxique de l'anticorps O.
Rev. Immunol. 1938 - **4** - 40.
- 38 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries.
V - Sur le pouvoir vaccinant de l'antigène O et sur l'action anti-infectieuse de l'anticorps O.
Rev. Immunol. 1938 - **4** - 197.
- 39 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques et les endotoxines des bactéries.
VI - Sur la nature chimique et sur les propriétés biologiques des antigènes O et Vi du bacille typhique.
Rev. Immunol. 1938 - **4** - 469.
- 40 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Sur l'action antiendotoxique de l'anticorps O formé dans l'organisme en réponse à l'injection d'un antigène glucido-lipidique (antigène O) -
C.r. Soc. Biol. 1938 - **127** - 752.
- 41 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique.
Sur la nature chimique des antigènes O et Vi.
C.r. Soc. Biol. 1938 - **128** - 5.
- 42 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. - Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique.
Sur quelques propriétés biologiques comparées des antigènes O et Vi.
C.r. Soc. Biol. 1938 - **128** - 9.

- 43 - BOIVIN A. et MESROBEANU L. Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique. Sur l'action immunisante antiendotoxique des deux complexes glucidolipidiques qui représentent les antigènes O et Vi du bacille d'Eberth.
C.r. Soc. Biol. 1938 - **128** - 835.
- 44 - BOIVIN A. - Sur le fractionnement par ultracentrifugation de l'antigène O, endotoxine du bacille d'Eberth.
C.r. Ac. Sc. 1939 - **209** - 416.
- 45 - BOIVIN A. - Sur l'existence d'un antigène somatique non protéique commun aux variantes S et R des Salmonelles.
C.r. Ac. Sc. 1939 - **209** - 494.
- 46 - BOIVIN A. - Virulence, pouvoir vaccinant et constitution antigénique des Salmonella.
Bull. Ac. Méd. 1940 - **123** - 564.
- 47 - BOIVIN A. - Constitution antigénique, virulence et pouvoir vaccinant du bacille typhique.
Bull. Ac. Méd. 1941 - **124** - 145.
- 48 - BOIVIN A., DELAUNAY A. et SARCIRON R. - Sur la détoxification par le formol des antigènes glucido-lipidiques (endotoxines) des bactéries.
C.R. Soc. Biol. 1941 - **135** - 1.142.
- 49 - BOIVIN A. - Pouvoir vaccinant et structure antigénique des Salmonella.
Rev. Immunol. 1942 - **7** - 16.
- 50 - BOIVIN A. et DELAUNAY A. - Endotoxines bactériennes, phagocytose et infections. Sur certains aspects nouveaux du conflit entre bactéries pathogènes et organisme.
Bull. Ac. Méd. 1943 - **127** - 274.
- 51 - BOIVIN A. et DELAUNAY A. - L'action pro-infectieuse des antigènes glucido-lipidiques. Faits nouveaux et mécanisme de l'effet agressif.
Rev. Immunol. 1943 - **8** - 148.
- 52 - BOIVIN A., DELAUNAY A. et LEHOULT Y. - Sur l'impossibilité de distinguer de façon absolue les haptènes et les antigènes O complets des bactéries.
C.r. Soc. Biol. 1944 - **138** - 398.
- 53 - BONET-MAURY P., JUDE A. et SERVANT P. - La mesure statistique de la virulence et de l'immunité. Application à l'étude de la virulence du bacille typhique et à la mesure du pouvoir immunisant des vaccins antityphoïdiques.
Rev. Immunol. 1954 - **18** - 21.
- 54 - BONNEFOI A. et GRABAR J. - Contrôle de l'efficacité des vaccinations antityphoparatyphoïdiques. Le test de séro-protection.
Bull. Ac. Méd. 1946 - **130** - 484.
- 55 - BOROFF D.A. et MACRI B.P. - Study of toxins and antigens of Shigella dysenteriae. II - Active protection of rabbits with whole organisms and fractions of Shigella dysenteriae.
J. Bact. 1949 - **58** - 387.
- 56 - BOSCO G. + Proprieta immunologica e immunochemica di lisati batterici ottenuti con ultrasuoni.
R. C. Ist. super. Sanita 1950 - **13** - 57.
- 57 - BRANHAM S.E. - Toxic products of bacterium enteritidis and of related microorganisms.
J. Inf. Dis. 1925 - **37** - 285.
- 58 - BRANHAM S.E., ROBEY L. et DAY L.A. - A poison produced by B. enteritidis and B. Aertrycke. which is active in mice when given by mouth.
J. Inf. Dis. 1928 - **43** - 507.
- 59 - BRIEGER L. et FRAENKEL - Untersuchungen über Bakteriengifte.
Berlin. Klin. Woch. 1890 N° 11 - 12.

- 60 - BRIEGER L., KITASATO S. et WASSERMANN A. - Ueber Immunität und Giftfestigung.
Z. f. Hyg. Infekt. 1892 - **12** - 137.
- 61 - BUTTLER A.M. et MONTGOMERY H. - The solubility of the plasma proteins.
I - Dependence on salt and plasma concentrations in concentrated solutions of Potassium Phosphate.
J. Biol. Chem. 1933 - **99** - 173.
- 62 - CASPER W. - Ueber die C Substanz der Paratyphusbazillen.
Z. f. Hyg. Infekt. 1928 - **109** - 170.
- 63 - CATHEART - The toxin of the bacillus enteritidis Gärtner.
J. Hyg. 1906 - **6** - 112.
- 64 - CHANTEMESSE et WIDAL - Recherches sur le bacille typhique et l'étiologie de la fièvre typhoïde.
Arch. Physiol. 1887 - p. 17.
- 65 - CHANTEMESSE et WIDAL - De l'immunité contre le virus de la fièvre typhoïde conférée par des substances solubles.
Ann. Inst. Pasteur 1888 - **2** - 54.
- 65a - CHANTEMESSE et WIDAL - Etude expérimentale sur l'exaltation, l'immunisation et la thérapeutique de l'infection typhique.
Ann. Inst. Pasteur 1892 - **6** - 755.
- 66 - CHANTEMESSE - Sur la toxine typhoïde soluble.
C.r. Soc. Biol. 1897 - **49** - 96.
- 67 - CHEN T.H. - Studies on immunization against plague.
IV - The methode of the hemagglutination test and some observations on the antigen.
J. Immunol. 1952 - **69** - 587.
- 68 - CHEN T.H. et MEYER K.F. - Studies on immunization against plague.
VII A hemagglutination test with the protein fraction of Pasteurella Pestis : a serologic comparison of virulent and avirulent strains with observations on the structure of the bacterial cells and its relationship to infection and immunity.
J. Immunol. 1954 - **72** - 282.
- 69 - COMBIESCO D., COMBIESCO C. et SORU E.
Quelques propriétés physicochimiques, biologiques et sérologiques des antigènes glucido-lipidiques des bacilles typhiques.
C.R. Soc. Biol. 1937 - **126** - 1.081.
- 70 - COMBIESCO D., COMBIESCO C. et SORU E. Sur les propriétés immunologiques des complexes glucido-lipidiques extraits de bacilles typhiques.
C.r. Soc. Biol. 1938 - **129** - 413.
- 71 - COMBIESCO D., COMBIESCO C. et SORU E. - Etude des propriétés chimiques des antigènes des bacilles typhiques.
C.r. Soc. Biol. 1938 - **129** - 1.003, 1.006 et 1.036.
- 72 - CONRADT - Ueber lösliche durch aseptische Autolyse erhaltene Giftstoffe von Ruhr - und Typhus - bazillen - Deutsche mediz. Woch. 1903 N° 2 p. 26.
- 73 - CO TUI F. W., HOPE D., SCHRIFT M.H., POWERS J., WALLEN A. et SCHMIDT L. - Purified pyrogen from Eberthella typhosa - J. Lab. Clin. Med. 1944 - **29** - 58.
- 74 - DELAFIELD M.E. - Changes in the blood sugar and blood phosphorus in rabbits following the injection of suspensions of bact. Aërtrycke.
J. Path. 1931 - **34** - 177.

- 75 - DELAFIELD M.E. - Blood - sugar changes and toxic effects produced in rabbits by certain fractions derived from bact. Aërtrycke.
Brit. J. exp. Path. 1934 - **15** - 130.
- 76 - DELAUNAY A. - Mise en évidence d'une nouvelle propriété des antigènes glucido-lipidiques : leur pouvoir leucopénisant.
C.r. Soc. Biol. 1943 - **137** - 589.
- 77 - DELAUNAY A. et LASFARGUES E. - Sur le pouvoir nécrosant de l'exotoxine staphylococcique et de l'endotoxine typhique observées comparativement in vivo et in vitro.
C.r. Soc. Biol. 1945 - **139** - 363.
- 78 - DENNIS E.W. - Toxicity of acid-soluble typhoid toxine for laboratory animals.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1939 - **42** - 553.
- 79 - DENNIS E.W. et SENEKJIAN H. - Leucocidal toxin extracted from typhoid bacilli.
Am. J. Hyg. 1939 - **30 b** - 103.
- 79a - DIGEON M., RAYNAUD M. et TURPIN A. - Etude de la toxine R2 du bacille typhique (*Eberthella typhosa*).
Ann. Inst. Pasteur 1952 - **82** - 206.
- 79b - DIGEON M. et RAYNAUD M. - Propriétés vaccinales de la toxine R2 du bacille typhique.
C.r. Ac. Sc. 1954 - **239** - 1.718.
- 79c - DIGEON M., MANGALO R., TURPIN A. et RAYNAUD M. - Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique.
IV - Propriétés immunologiques des différentes fractions obtenues (réactions de précipitation et de déviation du complément).
Ann. Inst. Pasteur 1955 - **88** - 170.
- 80 - van DORN SMITH E. - Heat stability and serologic activity of extracts of the typhoid bacillus.
J. Inf. Dis. 1938 - **63** - 21.
- 81 - DOUGLAS S.R. et FLEMMING A. - On the antigenic properties of acetone-extracted bacteria.
Brit. J. exp. Path. 1921 - **2** - 131.
- 82 - DOUGLAS S.R. - On some characters of the cleavage products of certain bacteria, with special reference to their toxicity and antigen properties.
Brit. J. exp. Path. 1921 - **2** - 175.
- 83 - DUBOS R.J. et GEIGER J.W. - Preparation and properties of Shiga toxin and toxoid.
J. exp. Med. 1946 - **84** - 143.
- 84 - ECKER E.E. - The pathogenic effect and nature of a toxin produced by *B. paratyphosus B*.
J. Inf. Dis. 1917 - **21** - 541.
- 85 - ECKER E.E. et MEGRAIL E. - Production of toxic substances in young cultures of single cell strains of *B paratyphosus B* - J. Inf. Dis. 1925 - **37** - 546.
- 86 - ECKER E.E. et RIMINGTON C. - A preliminary study of the chemical nature of the toxic substances produced by the *Salmonella* group of organisms.
J. Hyg. 1927 - **27** - 44.
- 87 - ENGLESBERG E. et LEVY J.B. - Studies on immunization against plague.
VI - Growth of *Pasteurella pestis* and the production of the envelope and the other soluble antigens in a casein hydrolysate mineral glucose medium.
J. Bact. 1954 - **67** - 438.
- 88 - FAVORITE G.O. et MORGAN H.R. - Effects produced by the intravenous injection in man of a toxic antigenic material derived from *Eberthella typhosa* : clinical, hematological, chemical and serological studies.
J. Clin. Invest. 1942 - **21** - 589.

- 89 - FELIX A. et PITT R.M. - A new antigen of B. typhosus. Its relation to virulence and to active and passive immunization.
Lancet 1934 - **227** - 186.
- 90 - FELIX A. et PITT R. M. - Virulence of B. typhosus and resistance to O antibody.
J. Path. Bact. 1934 - **38** - 409.
- 91 - FELIX A., BHATNAGAR S.S. et PITT R.M. - Observations on the properties of the Vi antigen of B. typhosus.
Brit. J. exp. Path. 1934 - **15** - 346.
- 92 - FRAENKEL E. et SIMMONDS M. - Weitere Untersuchungen über die Aetiologie des Abdominal-typhus.
Z. f. Hyg. 1887 - **2** - 138.
- 93 - FRAPPIER A. et SHERMAN L. - Propriétés pro-infectieuses de certains filtrats de culture de S. typhi.
C.r. Ac. Sc. 1952 - **234** - 1.810.
- 94 - FRAPPIER A. et SONEA S. - Apparition précoce d'antigène O dans les filtrats des cultures jeunes de bacille typhique - Canad. J. Publ. Health 1953 - **44** - 21.
- 95 - FREEMAN G.G. et ANDERSON T.H. - The hydrolytic degradation of the antigenic complex of Bact. typhosum Ty2.
Biochem. J. 1941 - **35** - 564.
- 96 - FREEMAN G.G. - The preparation and properties of a specific polysaccharide from Bact. typhosum Ty2.
Biochem. J. 1942 - **36** - 340.
- 97 - FREEMAN G.G. - The components of the antigenic complex of Salmonella typhimurium.
Biochem. J. 1943 - **37** - 601.
- 98 - FREUND J. et MC DERMOTT K. - Sensitization to Horse Serum by means of adjuvants.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1942 - **49** - 548.
- 99 - FREUND J. et BONANTO M.V. - The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacilli on immunization with diphtheria toxoid and bact. typhosum.
J. Immunol. 1944 - **48** - 325.
- 100 - FREUND J. et WALTER A.W. - Saprophytic acid-fast bacilli and paraffin oil as adjuvants in immunization.
Proc. soc. exp. Biol. Med. 1944 - **56** - 47.
- 101 - FROMME I., LUDERITZ O. et WESTPHAL O. - Ueber bakterielle Reizstoffe - V - Identifizierung der Zuckerbausteine eines pyrogenen Lipopolysaccharids aus E. Coli mittels Paplerchromatographie und der Schwefelsäure-cystein-Reaktion nach Dische.
Z. Naturforsch. 1954 - **9b** - 303.
- 102 - FUKUHARA Y. et ANDO J. - Ueber die Bakteriengifte, insbesondere die Bakterienleibesgifte.
Z. Immunitätsf. 1913 - **18** - 350.
- 103 - FURTH J. - Further observations on the extraction of precipitable substances of bacilli.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1927 - **24** - 602.
- 104 - FURTH J. et LANDSTEINER K. - Further observations on the precipitable substances of B. typhosus and B. paratyphosus B.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1927 - **24** - 771.
- 105 - FURTH J. et LANDSTEINER K. - On precipitable substances derived from bacillus typhosus and bacillus paratyphosus B - J. exp. Med. 1928 - **47** - 171.

- 106 - FURTH J. et LANDSTEINER K. - Studies on precipitable substances of Bacilli of the Salmonella group.
J. exp. Med. 1929 - 49 - 727.
- 107 - GASTINEL et REILLY J. - Sur l'action pathogène des antigènes glucido-lipidiques du bacille d'Eberth.
C.r. Soc. Biol. 1940 - 134 - 456.
- 108 - GINGER L.G., NESSET N.M., RIEGEL B. et FITZSIMONS E.J. - Bacterial pyrogens.
.II - Pyrogenetic preparations from various bacterial species.
J. Am. Pharm. Assoc. 1951 - 40 - 421.
- 109 - GINSBURG E.B., RIACHINA E.M. - Ueber die Natur der Bakterientoxine - Das Typhustoxine.
Giorn. Batt. Immun. 1936 - 17 - 347.
- 110 - GIOVANARDI -
Boll. Sez. Ital. Soc. Inter. Microbiol. 1937 - 9 - 130.
- 111 - GOEBEL W.F., BINKLEY F. et PERLMAN E. - Studies on the Flexner group of dysentery bacilli.
I - The specific antigen of Shigella paradysenteriae Flexner.
J. exp. Med. 1945 - 81 - 315.
- 112 - GOTTSTEIN - Ueber die giftige und immunisierende Wirkung Pepsin verdauter Typhusbazillen.
Deutsch. Arch. klin. Med. 1908 - 94 - H 3 - 4.
- 113 - GOYLE A.N. - A comparison of the pathogenicity for mice of the normal and rough forms of Salmonella enteritidis (Gärtner).
J. Path. Bact. 1926 - 29 - 365.
- 114 - GRASSET E. et GORY - Sur l'immunisation antityphique du cobaye. Propriétés du sérum des animaux immunisés.
C.r. Soc. Biol. 1927 - 96 - 180.
- 115 - GRASSET E. et GORY - Vaccination, Hyperimmunisation et sérothérapie antityphoïdique expérimentales au moyen des autolysats formolés.
C.r. Soc. Biol. 1927 - 97 - 1.211.
- 116 - GRASSET E. - Sérum antityphoïdique concentré et purifié. Technique de préparation - Applications cliniques.
C.r. Soc. Biol. 1931 - 106 - 810.
- 117 - GRASSET E. - Sur les propriétés antigéniques des autolysats microbiens formolés dans la préparation des vaccins microbiens et sérums thérapeutiques.
C.r. Soc. Biol. 1933 - 113 - 20.
- 118 - GRASSET E. - Rapports entre la toxicité, le pouvoir antigénique et flocculant de l'endotoxine et de l'endo-anatoxine du bacille typhique.
C.r. Soc. Biol. 1934 - 115 - 1.485.
- 119 - GRASSET E. - Vaccination antityphoïdique humaine au moyen de l'endoanatoxine typhique.
C.r. Soc. Biol. 1934 - 115 - 1.599.
- 120 - GRASSET E. - Sur l'endotoxine typhique obtenue par congélation répétée.
C.r. Soc. Biol. 1935 - 118 - 765.
- 121 - GRASSET E. et LEWIN W. - Vaccination antityphique par l'endoanatoxine typhique précipitée par l'alun.
C.r. Soc. Biol. 1937 - 125 - 979.
- 122 - GRASSET E. - L'endoanatoxine typhoparatyphique dans la prophylaxie des infections typhoïdiques - Applications et résultats d'ensemble de quinze ans de vaccination (1934 à 1948).
Rev. Immunol. 1951 - 15 - 1.

- 123 - GREENWOOD M., TOPLEY W.W.C. et WILSON J. - Contribution to the experimental study of epidemiology. The effect of vaccination on herd mortality.
J. Hyg. 1931 - **31** - 257.
- 124 - GRINNEL F. B. - A study of the comparative value of rough and smooth strains of B. typhosus in the preparation of typhoid vaccines.
J. Immunol. 1930 - **19** - 457.
- 125 - GRINNEL F.B. - Studies on the relationship of certain variants of B. typhosus.
I - Agglutination and agglutinin absorption.
J. exp. Med. 1931 - **54** - 577.
- 126 - GRINNEL F.B. - A study of the dissociation of the Rawlings strain of Bacterium typhosum with special reference to its use in the production of antityphoid vaccine.
J. exp. Med. 1932 - **56** - 907.
- 127 - HAGEDORN H.C. et JENSEN B.N. - Zur microbestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid.
Bioch. Z. 1923 - **135** - 46.
- 128 - HAHN M. Ueber cholera - und Typhusendotoxine.
Münch. med. Woch. 1906 p. 1.098.
- 129 - HALE W.M. - The immunizing value for mice of vaccines prepared from R and S B. enteritidis.
Yale J. Biol. Med. 1936 - **8** - 357.
- 130 - HEIDELBERGER M. et KENDALL E.F. - Quantitative studies on the specific reaction, the determination of small amounts of a specific polysaccharide.
J. exp. Med. 1932 - **55** - 555.
- 131 - HENDERSON D.W. et MORGAN W.T.J. - The isolation of antigenic substances from strains of Bact. typhosum.
Brit. J. Exp. Path. 1938 - **19** - 82.
- 132 - HENDERSON D.W. - The protective value of the Vi and the O antibody in relation to the virulence of strains of Bact. typhosum.
Brit. J. exp. Path. 1939 - **20** - 1.
- 133 - HENDERSON D.W. - Experiments with the Vi antigen of Bact. typhosum and with two new antigenic substances extracted from strains of this organism.
Brit. J. Exp. Path. 1939 - **20** - 11.
- 134 - HOLT L. B. - The developments in diphtheria prophylaxis.
1 vol. London 1950 p. 173.
- 135 - HORECKER B.L., MA T.S. et HAAS E. - Note on the determination of microquantities of organic phosphorus.
J. Biol. Chem. 1940 - **136** - 775.
- 136 - HORNUS G. et BAUDOUY C. - Recherches sur la dissociation des bacilles paratyphiques A. La réaction de Millon.
C.r. Soc. Biol. 1935 - **118** - 634.
- 137 - HORNUS G. et BAUDOUY C. - Recherches sur la dissociation des bacilles paratyphiques A. Les agglutinations non spécifiques.
C.r. Soc. Biol. 1935 - **118** - 1.288.
- 138 - HOSoya S., HOMMA Y., EGAMI F. et YAGI Y. - On the isolation of antigenic substances from pseudomonas aeruginosa.
Japan J. exp. Med. 1949 - **20** - 55.
- 139 - IBRAHAM H.M. et SCHUTZE H. - A comparison of the prophylactic values of the H, O and R antigens of Salmonella Aertrycke together with some observations on the toxicity of its smooth and rough variants.
Brit. J. exp. Path. 1928 - **9** - 353.

- 140 - IKAWA M., KOEPFLI J.B., MUDD S.G. et NIEMAN C. - An agent from E. Coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor.
I - Isolation and properties.
J. Nat. Cancer Res. 1952 - **13** - 157.
- 141 - IKAWA M., KOEPFLI J.B., MUDD S.G. et NIEMAN C. - An agent from E. Coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor.
The component monosaccharides.
J. Am. Chem. Soc. 1952 - **74** - 5.219.
- 142 - IKAWA M., KOEPFLI J.B., MUDD S.G. et NIEMAN C. - An agent from E. Coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor.
III - The component Fatty Acids of the Phospholipid moiety.
J. Am. Chem. Soc. 1953 - **75** - 1.035.
- 143 - IKAWA M., KOEPFLI J.B., MUDD S.G. et NIEMAN C. - An agent from E. Coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor.
IV - Some nitrogenous components of the Phospholipid moiety.
J. Am. Chem. Soc. 1953 - **75** - 3.439.
- 144 - IOSHIOKA M. - Ueber das Bakteriengift, insbesondere die löslichen Gifte des Dysenterie-Typhus + und Paratyphusbazillus.
Z. Immunitätsf. 1923 - **36** - 395.
- 145 - IOSHIOKA M. - Ueber das Bakteriengift insbesondere Typhustrockengift und seine therapeutische Anwendung.
Z. Immunitätsf. 1923 - **37** - 248.
- 146 - IVANOVICS - Ueber die toxische substanz von Breslaubazillen -
Z. Immunitätsf. 1936 - **87** - 310.
- 147 - JANBON M., BERTRAND L. et PUECH P. - Le syndrome sympathique abdominal "pseudo-perforatif" des fièvres typhoïdes traitées par le chloramphénicol.
Bull. Mém. Soc. Méd. Hop. Paris 1950 - **66** - 1.528.
- 148 - JOBLING J. I. et BULL C.G. - Studies in ferment action.
VII - Toxic split products of Bacillus typhosus.
J. exp. Med. 1913 - **17** - 453.
- 149 - KABAT E.A. et MAYER M.M. - Experimental immunochemistry.
1 vol. Springfield - 1948.
- 150 - KAMINSKI M. et OUCHTERLONY O. - Etudes immunochimiques qualitatives et quantitatives des protéides du blanc d'oeuf.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 - **37** - 758.
- 151 - KAUFFMANN F. - Der antigen-Aufbau der Typhus - Paratyphus-gruppe.
Z. f. Hyg. Infekt. 1930 - **111** - 233.
- 152 - KAUFFMANN F. et MITSUI C. - Vergleichende Untersuchungen in der Typhus - Paratyphus - Gruppe.
Z. f. Hyg. Infekt. 1930 - **111** - 749.
- 153 - KAUFFMANN F. - Ueber die Bedeutung des VI-Antigens für die Typhusimmunität der Maus.
Z. f. Hyg. Infekt. 1937 - **120** - 31.
- 154 - KAUFFMANN F. - Die Bakteriologie der Salmonella Gruppe.
1 vol. Copenhagen - 1941.
- 155 - KOURILSKY R. KOURILSKY S. et BOIVIN A. - Sur l'action immunisante chez l'homme de l'antigène glucido-lipidique O du bacille d'Eberth.
C.r. Soc. Biol. 1939 - **131** - 190.
- 156 - KRAUS et STENITZER - Ueber die Toxin des Typhusbazillen.
Wien. klin. Woch. 1907 - **20** - 344.

- 157 - KRÖGER E. - Zum sogenannte "R Antigen" in gramnegativen Darmbakterien.
Z. Immunitätsf. 1953 - **110** - 414.
- 158 - KRÖGER E. - Experimentelle Untersuchungen zum morphologischen S/R und antigenen O/o -
Formenwechsel gramnegativer Darmbakterien.
Z. Naturforsch. 1953 - **8B** - 133.
- 159 - KRÖGER E. - Experimentelle Untersuchungen zum morphologischen S/R - und antigenen O/o -
Formenwechsel gramnegativer Darmbakterien.
Zbl. Bakt. I Orig. 1953 - **160** - 242.
- 160 - KRUMWIEDE C. et COOPER G.M. - A study of the specificity of the absorption of antibac-
terial precipitins.
J. Immunol. 1920 - **5** - 547.
- 161 - KURIZUKA K. - Endotoxin of Salmonella typhi.
Japan J. Bact. 1951 - **6** - 99.
- 162 - LANDSTEINER K. et FURTH J. - Extraction of precipitable substances of bacilli with
dilute alcohol.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1927 - **24** - 379.
- 163 - LANDSTEINER K. et FURTH J. - Precipitable substances prepared from Bacilli of the
Salmonella group.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1928 - **25** - 565.
- 164 - LANDUCCI J.M., POURADIER J. et PIMONT M. - Remarques sur la recherche des hydrates de
carbone dans les protéines.
Bull. Soc. Chim. Fr. 1953 - **11-12** - 1.072.
- 165 - LANDY M. et WEBSTER M.E. - Studies on Vi Antigen.
III - Immunological properties of purified Vi Antigen derived from Escherichia Coli
5396/33.
J. Immunol. 1952 - **69** - 143.
- 166 - LANDY M. et TRAPANI R.J. - A hemagglutination test for plague antibody with purified
capsular antigen of Pasteurella pestis.
Am. J. Hyg. 1954 - **59** - 150.
- 167 - LANGE - Sur une exotoxine du bacille typhique.
C.r. Soc. Biol. 1905 - **58** - 771.
- 168 - LASFARGUES E. - Cultures de tissus et immunologie.
I - Etude du pouvoir nécrosant des toxines microbiennes in vitro.
Rev. Immunol. 1946 - **10** - 45.
- 169 - LEPIE et LYONNET - Sur un mode de préparation de la toxine typhique.
Lyon Med. 1898 - N° 46 - 343.
- 170 - LITCHFIELD J.T. jr et FERTIG - On a graphic solution of the dosage-effect curve.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 1941 - **69** - 276.
- 171 - LITCHFIELD J.T jr et WILCOXON F. - A simplified method of evaluating dose-effect expe-
riments.
J. Pharm. exp. Therap. 1949 - **96** - 99.
- 172 - LITCHFIELD J.T jr - A method for rapid graphic solution of time - per cent effect
curves.
J. Pharm. exp. Therap. 1949 - **97** - 399.
- 173 - LÜDERITZ O. et WESTPHAL O. - Ueber bakterielle Reizstoffe.
II - Qualitative und quantitative papierchromatographische Bestimmung der Zucker-
bausteine eines hochgereinigten Polysaccharid-Pyrogens aus Colibakterien.
Z. Naturforsch. 1952 - **7b** - 548.

- 174 - MACFADYEN et ROWLAND - Intracellular toxin of the typhoid bacillus.
Proc. Royal Soc. 1902 - **71** - 77.
- 175 - MACFADYEN - Upon the immunizing effects of the intracellular contents of the typhoid bacillus as obtained by the desintegration of the organism at the temperature of liquid air.
Proc. Royal Soc. 1902 - **71** - 356.
- 176 - MACFADYEN et ROWLAND - Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus.
Zbl. Bakt. I Orig. 1903 - **34** - 618 et 765.
- 177 - MACKENZIE G.M., PIKE R.M. et SWINNEY R.E. - Virulence of Salmonella typhi murium.
II - Studies of the polysaccharide-antigens of virulent and avirulent strains.
J. Bact. 1940 - **40** - 197.
- 178 - MALTANER F. - A study of smooth and rough forms of the typhoid bacillus in relation to prophylactic vaccination and immunity in typhoid fever.
J. Immunol. 1934 - **26** - 161.
- 179 - MARTIN A.R. - The toxicity for mice of certain fractions isolated from Bac. Aertrycke.
Brit. J. exp. Path. 1934 - **15** - 137.
- 180 - MARTIN D.S. - A simplified serum dilution method for the quantitative titration of precipitins in a pure antigen - antibody system.
J. Lab. clin. Med. 1943 - **28** - 1.477.
- 181 - MEJBAUM - Ueber die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in derivaten der Adenylsäure.
Z. Physiol. Chem. 1939 - **258** - 117.
- 182 - MENTEN - Soluble toxic products of the enteritidis paratyphoid B group and their action especially in relation to blood sugar.
J. Inf. Dis. 1926 - **38** - 354.
- 183 - MENTEN et KING - Chemical studies on the toxin produced by B. paratyphosus B (Aertrycke type).
J. Inf. Dis. 1930 - 46 - 275.
- 184 - de MERRE L.J. et PROBEY T.F. - Les pyrogènes.
Act. Med. Chirug. oct. 1945 - N° 8 p. 1 à 51.
- 185 - MESROBEANU L. - Les antigènes glucido-lipidiques des bactéries (étude chimique et biologique).
Thèse Sciences - Strasbourg 1936.
- 186 - MOLLARET P., REILLY J., BASTIN R. et TOURNIER P. - Accidents du traitement des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes par le chloramphénicol (chloromycétine).
Bull. Mém. Soc. Méd. Hop. Paris 1950 - **66** - 85.
- 187 - MORESCHI - Sulla produzione di una tossina tifica solubile.
Arch. Sci. Med. 1905 - **29** - 357.
- 188 - MORGAN H.R. - Preparation of antigenic material inducing leucopenia from Eb. typhosa cultivated in synthetic medium.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1940 - **43** - 529.
- 189 - MORGAN H.R. - Immunologic properties of an antigenic material isolated from Eberthella typhosa.
J. Immunol. 1941 - **41** - 161.
- 190 - MORGAN H.R. - Pathologic changes produced in rabbits by a toxic somatic antigen derived from Eberthella typhosa.
Am. J. Path. 1943 - **19** - 135.

- 191 - MORGAN H.R. - Resistance to the action of the endotoxine of enteric bacilli in man.
J. clin. Invest. 1948 - **27** - 706.
- 192 - MORGAN W.T.J. - Studies in Immunochemistry.
I - The preparation and properties of a specific polysaccharide from Shigella dysenteriae.
Biochem. J. 1936 - **30** - 909.
- 193 - MORGAN W.T.J. - Studies in immunochemistry.
II - The isolation and properties of a specific antigenic substance from B. Dysenteriae (Shiga).
Biochem. J. 1937 - **31** - 2.003.
- 194 - MORGAN W.T.J. - Some observations on the specific antigen of B. dysenteriae (Shiga).
J. Soc. Chem. Ind. 1937 - **56** - 446.
- 195 - MORGAN W.T.J. et PARTRIDGE S.M. - Bacterial antigens.
Nature 1939 - **143** - 1.025.
- 196 - MORGAN W.T.J. et PARTRIDGE S.M. - Studies in Immunochemistry.
IV - The fractionation and nature of antigenic material isolated from Bact. dysenteriae (Shiga).
Biochem. J. 1940 - **34** - 169.
- 197 - MORGAN W.T.J. et PARTRIDGE S.M. - Studies in Immunochemistry.
VI - The use of phenol and of alkali in degradation of antigenic material isolated from B. dysenteriae (Shiga).
Biochem. J. 1941 - **35** - 1.140.
- 198 - MORGAN W.T.J. et PARTRIDGE S.M. - An examination of the O antigenic complex of Bacterium typhosum.
Brit. J. exp. Path. 1942 - **23** - 151.
- 199 - MORZYCKI J. et ZABLOCKI B. - Propriétés physico-chimiques et antigéniques de l'endotoxine typhique obtenue par la méthode des congélations répétées.
C.r. Soc. Biol. 1934 - **117** - 792.
- 200 - MUTERMILCH S. - Recherches sur la toxine typhique. Son action sur les leucocytes de lapin.
C.r. Soc. Biol. 1946 - **140** - 767.
- 201 - MUTERMILCH S. - Recherches sur la toxine typhique. Phénomènes d'immunité.
C.r. Soc. Biol. 1946 - **140** - 769.
- 202 - MUTERMILCH S. - Recherches sur les toxines du bacille d'Eberth et du para B.
Ann. Inst. Pasteur 1949 - **76** - 24.
- 203 - MUTERMILCH S. - Recherches sur la toxine typhique. L'action combinée du formol et de la chaleur sur la toxine typhique.
C.r. Soc. Biol. 1947 - **141** - 586.
- 204 - MUTERMILCH S. - Recherches sur la toxine typhique. Vaccination des lapins avec la toxine formolée.
C.r. Soc. Biol. 1947 - **141** - 538.
- 205 - NEEL R. et BALTAZARD M. - Mise au point d'une réaction d'hémagglutination protéinique pour la peste.
Ann. Inst. Pasteur 1954 - **86** - 18.
- 206 - OAKLEY C.L. et FULTHORPE A.J. - Antigenic analysis by diffusion.
J. Path. Bact. 1953 - **65** - 49.

- 207 - OUCHTERLONY O. - Antigen-Antibody reactions in gels.
Ark. Kemi. Min. Geol. 1948 - **B 25** - 14
- 208 - " " " " 1949 - **B 26** - 1
- 209 - " " " " 1950 - N° 1 - 43
- 210 - " " " " 1951 - N° 9 - 55
- 211 - OUCHTERLONY O. - In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria.
Acta Path. Microb. Scand. 1948 - **25** - 186.
- 212 - OUCHTERLONY O. - Antigen-Antibody reactions in gels.
Acta Path. Microb. Scand. 1949 - **26** - 507.
- 213 - OUCHTERLONY O. - In vitro method for testing the toxin - producing capacity of diphtheria bacteria.
Acta Path. Microb. Scand. 1949 - **26** - 516.
- 214 - OUCHTERLONY O. - Antigen-Antibody reaction in gels.
Acta Path. Microb. Scand. 1953 - **32** - 231.
- 215 - OUDIN J. - Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié.
C.r. Ac. Sc. 1946 - **222** - 115.
- 216 - OUDIN J. - L'analyse immunologique qualitative. Méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immun-sérum précipitant gélosé.
Ann. Inst. Past. 1948 - **75** - 30.
" " " 1948 - **75** - 109.
- 217 - PALMER J.W. et GERLOUCH T.D. - A simple method for preparing antigenic substances from the typhoid bacillus.
Science 1940 - **92** - 155.
- 218 - PAMPANA E.I. - La dissociazione microbicae la tripa flavina come suo reattivo.
Ann. Igiene 1931 - **41** - 537.
" " " " Microbic dissociation : detection of R variant by means of a specific drop-agglutination.
J. Hyg. 1933 - **33** - 402.
- 219 - PARTRIDGE S.M. et MORGAN W.T.J. - Immunization experiments with artificial complexes formed from substances isolated from the antigen of Bacterium Shigae.
Brit. J. exp. Path. 1940 - **21** - 180.
- 220 - PERRY H.M., FINDLAY H.T. et BENSTED H.J. - Antityphoid inoculation - The role of bacterium typhosum, strain Rawlings.
J. R.A.M.C. 1933 - **60** - 241.
- 221 - PERRY H.M., FINDLAY H.T. et BENSTED H.J. - Antityphoid inoculation ~ Observations on the immunizing properties and on the manufacture of typhoid vaccine.
J.R.A.M.C. 1934 - **62** - 161.
- 222 - PFEIFFER R. - Untersuchungen über das Cholera gift.
Z. Hyg. Infekt. 1891 - **11** - 393.
- 223 - PFEIFFER R. et KOLLE W. - Ueber die spezifische Immunitätsreaction der Typhus-bazillen.
Z. Hyg. Infekt. 1896 - **21** - 203.
- 224 - PFEIFFER R. et LUBINSKI H. - Ueber die Wirkung des Formalins auf Endotoxin.
Zbl. Bakt. I Orig. 1927 - **102** - 459.
- 225 - FON G et STAUB A.M. - Etude chimique du polyoside somatique typhique.
Bull. Soc. chim. biol. 1952 - **34** - 1.132.

- 226 - PON G. - Etude comparée chimique et immuno-chimique des Polyosides extraits de S.typhi, S. paratyphi B et S. Typhimurium.
Thèse Pharmacie - Paris 1954.
- 227 - POURSIDES Y. et GREBUS C. - La meningo-encéphalite typhique du cobaye par administration intracrânienne d'endotoxine et ses caractères histologiques.
C.r. Soc. Biol. 1950 - **144** - 557.
- 228 - RAISTRICK H. et TOPLEY W.W.C. - Immunizing fractions isolated from Bact. Aertrycke.
Brit. J. exp. Path. 1934 - **15** - 113.
- 229 - RANQUE et SENEZ - Action de l'iode sur le bacille d'Eberth.
C.r. Soc. Biol. 1913 - **74** - 57.
- 230 - RAYNAUD M. - Au sujet de la substance toxique neurotrope du bacille typhique (Eberthella typhosa).
Ann. inst. Pasteur 1946 - **72** - 691.
- 231 - RAYNAUD M. - Au sujet de la substance toxique neurotrope du bacille typhique (Eberthella typhosa).
II - Etude du pouvoir antigénique.
Ann. Inst. Pasteur 1947 - **73** - 191.
- 232 - RAYNAUD M. - Extraction de la toxine tétanique et de la toxine de Cl. Sordelli à partir des corps microbiens.
C.r. Ac. Sc. 1947 - **225** - 543.
- 233 - RAYNAUD M. - Extraction des exotoxines à partir des corps microbiens.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1949 - **31** - 98.
- 234 - RAYNAUD M. et SECOND - Extraction des toxines botuliniques à partir des corps microbiens.
Ann. Inst. Pasteur 1949 - **77** - 316.
- 234a - RAYNAUD M. et DIGEON M. - Sur une nouvelle toxine du bacille typhique extraite des formes rough.
C.r. Ac. Sc. 1949 - **229** - 564.
- 235 - RAYNAUD M., NISMAN B. et PRUDHOMME R.O. - Extraction de la toxine tétanique à partir des corps microbiens par les ultrasons.
C.r. Ac. Sc. 1950 - **230** - 1.370.
- 236 - REED L.J. et MUENCH H. - A simple method for estimating fifty per cent end points.
Am. J. Hyg. 1938 - **27** - 493.
- 237 - REILLY J., RIVALIER E., LAUNAY et STEFANESCO - Nouvelles recherches sur l'immunité typhique.
III - L'endotoxine typhique et l'immunité antiendotoxique.
Ann. Méd. 1933 - **33** - 388 et 433.
- 238 - REILLY J., RIVALIER E., COMPAGNON A et LAPLANE R. - Hémorragies, lésions vasculaires et lymphatiques du tube digestif déterminées par l'injection périsplanchnique de substances toxiques diverses.
C.r. Soc. Biol. 1934 - **116** - 24.
- 239 - REILLY J., RIVALIER E., COMPAGNON A., LAPLANE R et DU BUIT - Sur la pathogénie de la dothiéntérie.
I - La fièvre typhoïde expérimentale.
Ann. Méd. 1935 - **37** - 182.
- 240 - REILLY J., RIVALIER E., COMPAGNON A., LAPLANE R et DU BUIT - Sur la pathogénie de la dothiéntérie.
II - Le rôle du système neuro-végétatif dans la genèse des lésions intestinales.
Ann. Méd. 1935 - **37** - 321.

- 241 - REILLY J., COMPAGNON A., TOURNIER P., BASTIN R. et DU BUIT - Les accidents du traitement des fièvres typhoïdes par la chloromycétine.
Etude expérimentale et déductions thérapeutiques.
Ann. Méd. 1950 - 51 - 597.
- 242 - RELYVELD E.H., TURPIN A., LAFAILLE A., PARIS C. et RAYNAUD M. - Purification de la toxine diphtérique. Contrôle qualitatif des fractions par la méthode de précipitation spécifique en gel.
Ann. Inst. Pasteur 1954 - 87 - 301.
- 243 - ROBERTSON R.C. et YU H. - Leucopenia and the toxic substances of B. typhosus.
J. Hyg. 1938 - 38 - 299.
- 244 - ROBINSON E.S. et FLUSSER B.A. - Pyrogens. I - Isolation of pyrogens from various microorganisms.
J. Biol. Chem. 1944 - 153 - 529.
- 245 - ROCHE J., BOUCHILLOU S., et VAUDABLE-ROGER M. - Sur la teneur en magnésium et en zinc des phosphatases, en particulier de la phosphatase alcaline. (Intestin).
Bull. Soc. Chim. Biol. 1950 - 32 - 30.
- 246 - RODET - Sur les propriétés toxiques des cultures des bacilles d'Eberth et Coli. Toxicité comparée des produits solubles et des corps bacillaires.
C.r. Soc. Biol. 1898 - 50 - 756.
- 247 - RODET, LAGRIFFOUL et WAHBY - La toxine soluble du bacille d'Eberth.
C.r. Soc. Biol. 1904 - 56 - 794 et 998.
- 248 - SALIMBENI A.T. - Préparation de "solutions" toxiques à l'aide de l'autolyse.
Ann. Inst. Pasteur 1913 - 27 - 122.
- 249 - SANARELLI - Etudes sur la fièvre typhoïde expérimentale.
Ann. Inst. Pasteur 1894 - 8 - 193.
- 250 - SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.J. - Intestinal phosphatase.
J. Biol. Chem. 1943 - 149 - 369.
- 251 - SCHOLTENS R.T. - Der Glatt - Rauformenwechsel des Bakterium typhi.
Zbl. Bakt. I Orig. 1937 - 139 - 467.
- 252 - SCHRAMM G., WESTPHAL O. et LUDERITZ O. - Ueber bakterielle Reizstoffe.
III - Physicalisch - chemisches Verhalten eines hochgereinigten Coli-Pyrogens.
Z. Naturforsch. 1952 - 7b - 594.
- 253 - SCHUTZE H. - The permanence of the serological paratyphoid B types, with observations on the non-specificity of agglutination with rough variants.
J. Hyg. 1921 - 20 - 330.
- 254 - SCHUTZE H. - The envelope antigen of B. pestis and its antibody.
Brit. J. exp. Path. 1934 - 15 - 200.
- 255 - SEDALLIAN P., MARAL R., EXBRAYAT C. et GAILLARD L. - Morts rapides par collapsus après l'institution de traitements à la chloromycétine.
Bull. Mém. Soc. Méd. Hop. Paris 1950 - 66 - 50.
- 256 - SENEZ et RANQUE - Vaccination antityphique par le vaccin iodé.
C.r. Soc. Biol. 1913 - 75 - 669.
- 257 - SERTIC V. et BOULGAKOV N.A. - L'agglutination par la tryptaflavine des Salmonella de structure antigénique non spécifique.
C.r. Soc. Biol. 1936 - 123 - 951.
- 258 - SERTIC V. et BOULGAKOV N.A. - Réversion par acidification de l'agglutination par la tryptaflavine.
C.r. Soc. Biol. 1937 - 124 - 217.

- 259 - SIROTININ W. - Die Uebertragung von Typhusbazillen auf Versuchsthiere.
Z. Hyg. Infekt. 1886 - **1** - 465.
- 260 - TAKEDA Y. OHTA T. et SATO M. - The endotoxin of Salmonella typhosa.
I - Isolation of antigens and highly toxic substances from Salm. typhosa.
J. Biochem. 1944 - **36** - 407.
- 261 - TAKEDA Y., YAMASHITA T. et WATANABE T. - Studies on the biological properties of one of the cleavage products, the acid-insoluble substance of the active principles of the Schwartzman filtrate or the endotoxins of E. Coli and B. typhosus.
Japan J. exp. Med. 1949/50 - **20** - 235.
- 262 - TAL C. et GOEBEL W. - On the nature of the toxic component of the somatic antigen of Shigella paradysenteriae type Z (Flexner).
J. exp. Med. 1950 - **92** - 25.
- 263 - TARDIEU J. - Etude physio-pathologique de l'atteinte du diencéphale au cours de la fièvre typhoïde.
Presse Médicale 1942 p. 75.
- 264 - TAYON - Sur le microbe de la fièvre typhoïde de l'homme. Culture et Inoculations.
C.r. Ac. Sc. 1884 - **99** - 331.
- 265 - TAYON - Sur le microbe de la fièvre typhoïde de l'homme. Culture et Inoculations.
C.r. Ac. Sc. 1885 - **100** - 375.
- - - 1885 - **101** - 450.
- 266 - TEISSIER, REILLY J., RIVALIER E., CABBASSEDES et DELALANDE - Nouvelles recherches sur l'immunité typhique.
I - Le problème de l'immunité locale.
Ann. Méd. 1930 - **27** - 333.
- 267 - TEISSIER, REILLY J., RIVALIER E., CABBASSEDES et DELALANDE - Nouvelles recherches sur l'immunité typhique.
II - Le mécanisme de l'immunité générale.
Ann. Méd. 1930 - **28** - 524.
- 268 - TOPLEY W.W.C., RAISTRICK H., WILSON J., STACEY M. CHALLINOR S.W. et CLARKE O.J. - The immunizing potency of antigenic components isolated from different strains of Bact. typhosum.
Lancet 1937 - **232** - 252.
- 269 - TREFFERS H.P. - The detoxification by acetylation of soluble antigens from Shigella dysenteriae and Eberthella typhosa.
Science 1946 - **103** - 387.
- 270 - VINCENT H. - Néyrite périphérique expérimentale produite par la toxine typhique.
C.r. Soc. Biol. 1900 - **52** - 223.
- 271 - VINCENT H. - Sur les résultats de l'inoculation intracrânienne du bacille d'Eberth ou de sa toxine.
C.r. Soc. Biol. 1903 - **55** - 1.214.
- 272 - VINCENT H. - Sur la toxine typhique et sur la production d'un sérum spécifique contre la fièvre typhoïde.
C.r. Ac. Sc. 1915 - **161** - 220.
- 273 - VINCENT H. - Sur l'existence d'une toxine nouvelle autolabile et hyperlabile sécrétée par le bacille de la fièvre typhoïde.
C.r. Ac. Sc. 1942 - **214** - 400.
- 274 - VINCENT H. - Sur les propriétés de la neurotoxine sécrétée par le bacille de la fièvre typhoïde.
C.r. Ac. Sc. 1942 - **214** - 525.

- 275 - VINCENT H. - Sur les toxines secrétées par le bacille de la fièvre typhoïde et spécialement sur la toxine entérotope de cet agent pathogène.
C.R. Ac. Sc. 1943 - **216** - 707..
- 276 - VINCENT H. - La fièvre typhoïde, maladie d'intoxication. Etude des deux toxines (neurotoxine et entérotoxine) secrétées par son bacille pathogène.
Bull. Ac. Méd. 1945 - **129** - 145.
- 277 - VINCENT H. - Action expérimentale de la toxine neurotrope du bacille typhique sur les centres nerveux.
C.R. Ac. Sc. 1947 - **224** - 1.745.
- 278 - VINCENT H. - Présentation d'animaux soumis aux injections d'entérotoxine et de neurotoxine typhoïdiques.
Bull. Ac. Méd. 1947 - **131** - 351 et 366.
- 279 - VINCENT H. - Remarques à propos des réactions produites chez le cheval par les deux toxines du bacille typhique (neurotoxine et entérotoxine).
Bull. Ac. Méd. 1948 - **132** - 53.
- 280 - VINCENT H. - Sur la neurotoxine et l'entérotoxine typhoïdiques.
Bull. Ac. Méd. 1949 - **133** - 57.
- 281 - VIOLLE H. - Des syndromes provoqués par les antigènes glucido-lipidiques.
Bull. Ac. Méd. 1945 - **129** - 201.
- 282 - WALKER J. - A method for the isolation of toxic and immunizing fractions from Bact. of the Salmonella group.
Biochem. J. 1940 - **34** - 325.
- 282a- WALKER D.L., FOSTER L.E., CHEN T.H., LARSON A. et MEYER K.F. - Studies on immunization against plague.
V - Multiplication and persistence of virulent and avirulent Pasteurella pestis in mice and guinea pigs.
J. Immunol. 1953 - **70** - 245.
- 283 - WAHL R. et TERRADE A. - Libération de l'antigène glucido-lipidique de Salm. enteritidis, variété Danysz, par la lyse bactériophagique.
Ann. Inst. Pasteur 1950 - **79** - 332.
- 284 - WEBSTER M.E., LANDY M. et FREEMAN M.E. - Studies on VI antigen -
II - Purification of VI antigen from Escherichia Coli 5396/38.
J. Immunol. 1952 - **69** - 135.
- 285 - WEBSTER M.E., SAGIN J.F., LANDY M. et JOHNSON H.G. - Purification of the O Antigen of S. typhosa.
Bact. Proc. 1953 p. 58..
- 286 - WEGER P. - Ueber rein dargestellte hochwirksame Fieberstoffe.
Naturwiss. 1947 - **34** - 59.
- 287 - WEIL E. et FELIX A. - Weitere Untersuchungen über das Wesen der Fleckfieberagglutination.
Wien. Klin. Woch. 1917 - **30** - 1.509.
- 288 - WEIL E. et FELIX A. - Ueber den Doppeltypus der Rezeptoren in der Typhus - Paratyphus - Gruppe.
Z. Immunit. 1920 - **29** - 24.
- 289 - WERNER - Sur la toxine secrétée par le bacille typhique.
C.R. Soc. Biol. 1904 - **56** - 882.
- 290 - WESTPHAL O., LÜDERITZ O. et BISTER F. - Ueber die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser.
Z. Naturforsch. 1952 - **7b** - 148.

- 291 - WESTPHAL O., LÜDERITZ O., EICHENBERGER E. et KEIDERLING W. - Ueber bakterielle Reizstoffe.
I - Reindarstellung eines Polysaccharid-Pyrogens aus Bacterium Coll.
Z. Naturforsch. 1952 - **7b** - 536.
- 292 - WESTPHAL O., LÜDERITZ O., et KEIDERLING W. - Ueber die Wirkungsweise bakterieller Reizstoffe.
Zbl. Bkt. I Orig. 1952 - **158** - 152.
- 293 - WESTPHAL O., LÜDERITZ O. - Zur chemischen Analyse von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien - Neue Desoxyzucker sowie ein Beitrag zur chemischen Differenzierung einiger Glatt- und Rauformen.
6ème Congr. Int. Microb. Rome 1953 - N° 400.
- 294 - WESTPHAL O., LÜDERITZ O., FROMME I. et JOSEPH N. - Neue desoxyzucker als Bausteine von Polysaccharid-Symplexen gramnegativer Bakterien - Tyvelose und Abequose -
Angew. Chem. 1953 - **65** - 555.
- 295 - WESTPHAL O. et LÜDERITZ O. - Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien.
Angew. Chem. 1954 - **66** - 407.
- 296 - WHITE P.B. - Further studies of the Salmonella group.
Med. Res. Council. 1926 Spec. Rep. N° 103.
- 297 - WHITE P.B. - On the relation of the alcohol soluble constituents of bacteria to their spontaneous agglutination.
J. Path. Bact. 1927 - **30** - 113.
- 298 - WHITE P.B. - Further notes on spontaneous agglutination of bacteria.
J. Path. Bact. 1928 - **31** - 423.
- 299 - WHITE P.B. - Notes on the intestinal bacilli with special reference to smooth and rough races.
J. Path. Bact. 1929 - **32** - 85.
- 300 - WHITE P.B. - Observations on Salmonella agglutination and related phenomena - Fixation of somatic agglutinins by receptors in solution.
J. Path. Bact. 1931 - **34** - 325.
- 301 - WHITE P.B. - Observations on Salmonella agglutination and related phenomena - Concerning an alcohol-soluble antigen (substance Q).
J. Path. Bact. 1932 - **35** - 77.
- 302 - YAGI Y., EGAMI F. et HOSOYA S. - The endotoxine of Salmonella enteritidis.
I - The chemical nature of the endotoxine.
Japan J. exp. Med. 1949 - **20** - 245.
- 303 - YAMANOUCHI - Toxicité du filtrat des cultures en bouillon des bacilles typhiques et paratyphiques.
C.r. Soc. Biol. 1909 - **66** - 1.050.
- 304 - YATO M. - Typhoid toxin purified by absorption with aluminium hydroxyde.
I - The toxin of typhoid bacilli.
Japan Z. Microb. Path. 1932 - **26** - 1.015.
- 305 - YATO M. - Studies on the toxin of B typhosus.
II - Concentration and purification of the toxin of B. typhosus.
J. Orient. Med. 1932 - **16** - 73.
- 306 - YATO M. - Studies on the toxin of Bacillus typhosus.
IV - Influence of refined toxin on leucocyte picture of rabbits.
J. Orient. Med. 1933 - **19** - 45.

- 307 - YOKOYAMA S. - Etude sur le polyside de Salmonella typhi.
(japonais) Tohoku. Ig. Z. 1943 - **33** - 100.
- 308 - ZABLOCKI B. et MORZYCKI J. - Sur l'endotoxine des bacilles typhiques obtenue par congélations répétées.
C.r. Soc. Biol. 1934 - **117** - 789.
- 309 - ZAHL P. et HUTNER S. - Protection against the endotoxine of some gram-negative bacteria conferred by immunization with heterologous organisms.
Am. J. Hyg. 1944 - **39** - 189.
- 310 - ZINSSER H. et PARKER J.T. - Further studies on bacterial hypersusceptibility.
J. exp. Med. 1923 - **37** - 275.

* * * * *

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	Page 1
Historique	4
Travail personnel	8
Plan du travail	10
PREPARATION DE LA TOXINE	
Production des germes	11
Extraction de la toxine	11
Préparation de la toxine brute	12
Précipitation trichloracétique	13
Précipitation acétique	14
Divers essais de purification	15
Digestions protéolytique et phosphatasique	15
Essais de dissociation	16
Précipitation par l'alcool alcalin	18
Extraction de la toxine d'autres germes	20
PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	
Caractères généraux	21
Courbes d'absorption dans l'ultra-violet	21
Etude électrophorétique	22
Composition chimique	24
Fractionnement par hydrolyse acide courte selon la technique de Westphal	26
Fractionnement par ultra-centrifugation	28
PROPRIETES BIOLOGIQUES.ET IMMUNOLOGIQUES	
CHAPITRE I : Toxicité	
Dose minima mortelle	30
Dose minima réactive	30
Etude des effets toxiques sur l'animal	30
Thermostabilité de la toxine	35
Essais de détoxification	35
CHAPITRE II : Pouvoir antigénique	
Préparation des sérums	36
Réactions d'agglutination	42
Réactions de fixation du complément	45
Réactions de précipitation	51
Dilution limite de l'antigène	51
Dilution limite du sérum	53
Précipitation quantitative	54
Précipitation spécifique en gel	58
CHAPITRE III : Pouvoir vaccinant	
Immunité passive	62
Immunité active	68
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	
RESUME	
BIBLIOGRAPHIE	

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

"Les Polysaccharides du Bacille Tuberculeux".

Vu et approuvé :

Paris, le 5 Juin 1955

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

